

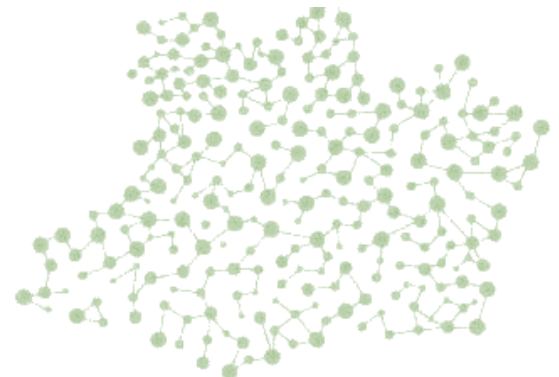


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE VETORES E RESERVATÓRIOS
SILVESTRES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM ÁREAS URBANAS,
PERIURBANAS E RURAIS DE COARI E MANAUS, AMAZONAS**

LAYLAH KELRE COSTA MAGALHAES



MANAUS

2022

LAYLAH KELRE COSTA MAGALHÃES

**ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE VETORES E RESERVATÓRIOS
SILVESTRES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM ÁREAS URBANAS,
PERIURBANAS E RURAIS DE COARI E MANAUS, AMAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção grau de *Doutor em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientadora: **Prof^ª** Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Co-Orientador: **Prof** Dr. Henrique Silveira

MANAUS

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

APRESENTAÇÃO:

Magalhaes, Laylah Kelre Costa

Aspectos Bioecológicos de vetores e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* em áreas urbanas, periurbanas e rurais de Coari e Manaus, Amazonas / Laylah Kelre Costa Magalhaes. - Manaus, 2022.

114f.: color.; 21 cm.

Tese – Pós-Graduação em Medicina Tropical – Doutorado em Doenças Tropicais e Infecciosas

Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Barbosa Guerra, Maria das Graças Vale;

Co-orientador: Henrique Manoel Condinho da Silveira

1. Doença de Chagas 2. *Didelphis*. 3. Haplotipos 4. *Rhodnius* 5. *Trypanosoma cruzi*.

I. Barbosa Guerra, Maria das Graças Vale (Orient.).

Silveira, Henrique Condinho da Silveira (Co-orient.)

II. Universidade do Estado do Amazonas.

III. Aspectos Bioecológicos de Vetores e Reservatórios Silvestres de *Trypanosoma cruzi* em Áreas Urbanas, Periurbanas e Rurais de Coari e Manaus.”

FOLHA DE JULGAMENTO**ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE VETORES E RESERVATÓRIOS SILVESTRES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM ÁREAS URBANAS, PERIURBANAS E RURAIS DE COARI E MANAUS****LAYLAH KELRE COSTA MAGALHÃES**

“Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

*A ti, Mãe, pois me educastes na obra
do AMOR.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom da vida e me conceder todas as necessidades em minha trajetória;

Aos meus pais, Raimundo Nonato Cordovil Magalhães e Ana Suzana Costa Magalhães (*in memoriam*), por servirem de exemplo na vida e por me mostrarem a importância do estudo e do saber;

Aos meus irmãos, Larissa, Kirley, Yvens, Laise, Lucas, Sophia e Pedro (*in memoriam*), por fazerem parte da minha vida;

Aos meus sobrinhos, João, Bernardo, Levi e Benjamim, por suas chatices e incansáveis tentativas de me fazer sorrir nos dias mais nublados;

Ao meu amado esposo, Agón Aristóteles, que além de meu companheiro, é meu melhor amigo e eterno namorado. Agradeço, sobretudo, pelas inúmeras vezes em que esteve ao meu lado, fortalecendo-me com palavras e por entender minhas ausências, sempre torcendo para o meu sucesso. Amo-te!

À querida professora Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, pelo acolhimento, apoio e confiança em minha capacidade para realizar esta tarefa, a qual muitas vezes pensei em desistir. Sempre esteve ali, guiando meus passos, desde o estágio voluntário, na época da graduação, se tornando, para mim, fonte de inspiração na pesquisa e na vida. Obrigada pela retidão de suas atitudes, nobreza de seu caráter, pela amizade e EXTREMA paciência;

Ao seu Nelson Fé, pelos importantes ensinamentos e por ser um fiel torcedor, desde a minha trajetória acadêmica até aqui;

À Comunidade Católica Hallel, pelo apoio espiritual nos dias mais tenebrosos;

À equipe da FIOCRUZ/RJ e ENSP (Laboratório de Entomologia e Ciências biológicas), pela valiosa contribuição na área entomologia e ELISA - Vetor, pelo entusiasmo na ciência e na vida;

À amiga de longa data, Suzane Prestes, a quem devo desde o início do mestrado. **E** pensar que tudo começou com um olhar de pouca amizade! Obrigada pelo apoio, gritos, estresses, choros, coices e contribuições fundamentais para a conclusão deste trabalho;

Ao trio parada dura, Rubens Celso Andrade Junior, Denison Vital e Matheus Martins, que, no decorrer destes anos, foram leais aos seus papéis e responsáveis por grandes gargalhadas no nosso ambiente de trabalho, deixando os dias mais agradáveis;

Aos amigos de laboratório do Centro de Entomologia, os quais desde o início da minha jornada no meio científico, continuam comigo, obrigada pela amizade e bons momentos

no trabalho e em lazer, pela paz transmitida e ótimas conversas. Vocês são gente boa demais!

À secretária da PPGMT, Iza, por aguentar minhas perturbações na secretaria, com reclamações, frequências atrasadas, desesperos e por, ainda, aguentar minha ansiedade;

Aos professores do PPGMT, pelo ensino transmitido;

Ao professor Dr. Wuelton Monteiro, e, também, ao atual coordenador do PPGMT, professor Dr. Vanderson Sampaio, deixo minha gratidão, em nome de todos que fazem parte deste programa;

À CAPES, pelo incentivo financeiro;

À FAPEAM, programa PPSUS, pelo subsídio financeiro, pois, sem este apoio, nada sairia do papel.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram deste projeto;

A todos os amigos que fiz nessa pós-graduação;

A todos os funcionários da limpeza e manutenção do Centro de Entomologia;

E aos não citados, porém jamais esquecidos, meu muito obrigada!

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Departamento de ciência e tecnologia – DECIT

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Programa de Pesquisa para o SUS – PPSUS

FAPEAM- Fundação de amparo à pesquisa

EPÍGRAFE

Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.

Confúcio

RESUMO

A Amazônia é atualmente o lugar que apresenta o maior número de casos da doença de Chagas na fase aguda. Essa região apresenta características próprias e muito particulares, no ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, envolvendo uma diversidade de espécie de mamíferos (reservatórios) e de triatomíneos (vetores), em ambientes silvestres, fato que a difere dos padrões de áreas endêmicas da América Latina. Nessa região, não há colonização de triatomíneos em ambientes domiciliares ou peridomiciliares porque os triatomíneos tem hábitos silvestres, e algumas espécies estabelecem suas colônias em palmeiras, por serem ambientes usados como habitat por aves e pequenos mamíferos, usados como fonte alimentar. Este estudo propôs investigar os aspectos da bioecologia dos vetores e dos reservatórios do *T. cruzi*, em ambientes rurais, periurbanos e urbanos. Foram realizadas coletas passivas de vetores em palmeiras e de reservatórios em áreas de mata e no ambiente domiciliar. Foi realizada investigação de infecção natural por *T. cruzi* utilizando técnicas biomoleculares. Foi feita ainda a identificação da fonte alimentar de vetores pela técnica de ELISA-vetor. Foram observadas diferenças entre a diversidade de espécies tanto de vetores quanto de reservatórios, bem como de espécies de palmeiras entre os ambientes estudados, sendo a área rural onde se registrou maior diversidade de espécies tanto de insetos quanto de reservatórios e de palmeiras. Foram registradas altas taxas de infecção natural por *T. cruzi* sendo 70% em *R. pictipes* e 86% em *D. marsupialis*. Os isolados de *T. cruzi* foram agrupados como TcI; o haplótipo prevalente foi o TcI COII1 (69,7%). Em *R. robustus* foi isolado o haplótipo HUM-13. Esse haplotipo já havia sido detectado em um portador de doença de Chagas crônica residente na mesma área rural estudada. As palmeiras, *Mauritia flexuosa* (a única espécie encontrada na área urbana) e *Attalea phalerata* foram as espécies com maior infestação por triatomíneos; as aves foram a fonte de alimento mais comum (27,71%). A presença de vetores e reservatórios, com elevadas taxas de infecções natural por *T. cruzi*, em ambientes próximo a moradias, evidenciam a vulnerabilidade da população, ao ciclo silvestre do *T. cruzi* e um potencial de risco para que humanos se tornem portadores da doença de Chagas.

Palavras Chaves: Doença de Chagas; *Didelphis*; *Rhodnius*; *Trypanosoma cruzi*; Haplotipos.

ABSTRACT

The Amazon is currently the place with the highest number of cases of Chagas disease in the acute phase. This region has its own and very particular characteristics in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi*, involving a diversity of species of mammals (reservoirs) and triatomines (vectors) in wild environments, a fact that differs from the patterns of endemic areas in Latin America. In this region, there is no colonization of triatomines in domestic or peridomiliary environments because these insects have wild habits, and some species establish their colonies in palm trees, as they are environments used as habitat for birds and small mammals, used as a food source. This study proposed to investigate aspects of the bioecology of *T. cruzi* vectors and reservoirs in rural, peri-urban and urban environments. Passive collections of vectors were carried out in palm trees and in reservoirs in forest areas and in the home environment. An investigation of natural infection by *T. cruzi* was carried out using biomolecular techniques. The identification of the food source of vectors was also carried out by the ELISA-vector technique. Differences were observed between the diversity of species of both vectors and reservoirs, as well as species of palm trees among the studied environments, being the rural area where the greatest diversity of species of insects, reservoirs and palm trees was recorded. High rates of natural infection by *T. cruzi* were recorded, being 70% in *R. pictipes* and 86% in *D. marsupialis*. *T. cruzi* isolates were grouped as TcI; the prevalent haplotype was TcI COII1 (69.7%). In *R. robustus*, the HUM-13 haplotype was isolated. This haplotype had already been detected in a patient with chronic Chagas disease residing in the same rural area studied. The palm trees *Mauritia flexuosa* (the only species found in the urban area) and *Attalea phalerata* were the species with the highest rate of infestation by triatomines; birds were the most common food source (27,71%). The presence of vectors and reservoirs, with high rates of natural infections by *T. cruzi*, in environments close to homes, show the vulnerability of the population to the sylvatic cycle of *T. cruzi* and a potential risk for humans to become carriers of the Chagas disease.

Keywords: Chagas disease; *Didelphis*; Haplotypes; *Rhodnius*; *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO LEIGO

A doença de Chagas é causada por um parasito, transmitido por um inseto conhecido como barbeiro. Esse inseto se alimenta de sangue de diversos animais, e no momento em que suga o sangue, ele também elimina suas fezes, no local da picada provoca coceira e uma pessoa ao coçar pode facilitar a entrada do parasito na sua corrente sanguínea. O parasito também pode entrar no organismo quando a pessoa leva as mãos aos olhos, ou boca. Nas áreas rurais das regiões nordeste, sul, sudeste e centro-oeste os barbeiros vivem dentro das residências. No entanto, na Amazônia esses insetos não vivem dentro das casas, mas podem ser atraídos pela luz e invadir residências. Em ambientes de floresta podem ser encontrados em tocas de animais, em ninhos de pássaros e em palmeiras tais como os buritizeiros, bacabeira e inajá. Pequenos animais como os gambás (mucuras) também são infectados com o parasito e podem também o transmitir se houver contato com o seu gás eliminado pelas glândulas anais. Nesse estudo foram encontrados em lugares próximo as moradias de pessoas que vivem tanto na área urbana, quanto periurbana e rural de Coari e Manaus: barbeiros em buritizeiros, bacaba e inajá bem como gambás (mucuras) infectados com o parasito causador da doença de Chagas.

LISTA DE FIGURAS TESE

- Figura 1** Demosntração do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 2** Cronograma das denominações de subpopulações de *T. cruzi*.
- Figura 3** Mapa ilustrativo sobre a distribuição espacial das linhagens de *T. cruzi*.
- Figura 4** Demosntração do ciclo de vida de *Pantronylus geniculatus*.
- Figura 5** Distribuição espacial de risco relativo de DCA por microrregião, com base no número de notificações de casos.

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

- Figura 1** Mapa ilustrando as áreas de estudo foi indicando locais positivos para vetores e marsupiais como hospedeiros do *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 2** Infecção natural por *Trypanosoma cruzi* encontrada em área urbana, periurbana e rural: diversidade de espécies de Palmeiras, vetores, mamíferos selvagens e fontes de alimento.
- Figura 3** Representação dos haplótipos identificados de *T. cruzi* como DTU TcI por sequenciamento do gene do citocromo oxidase Subunidade II.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies de triatomíneos e infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi* por área.

Tabela 2 Espécies de reservatórios e taxa natural de infecção geral por *Trypanosoma cruzi* total.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

DC - Doença de Chagas

DNA - Ácido – Desoxirribonucléico

dNTP - Deoxinucleotídeos trifosfato

DTU's – Discrete Typing Units (Unidades Distintas de Tipagem)

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

mL – Mililitro

µL – Microlitro

mM – Milimolar

ng – Nanograma

pb- pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

SMF - sistema mononuclear fagocitário

TcI - *Trypanosoma cruzi* I

TcII - *Trypanosoma cruzi* II

TcIII - *Trypanosoma cruzi* III

TcIV- *Trypanosoma cruzi* III

TcV - *Trypanosoma cruzi* V

TcVI - *Trypanosoma cruzi* VI

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1 Agente etiológico.....	16
1.1.1 Ciclo biológico.....	18
1.1.2 Heterogeneidade genética do <i>T. cruzi</i>	19
1.2. Vetores - Triatomíneos.....	25
1.3_Palmeiras	27
1.4 Reservatórios de <i>T. cruzi</i>	28
1.4.1_Ordem Didelphimorphia	29
1.4.2 Ordem Rodentia.....	30
1.4.3Ordem Carnivora	31
1.4.4 Ordem Xenartra	33
1.4.5 Ordem Chiroptera	34
1.4.6 Ordem Primatas.....	36
1.5 Doença de Chagas (DC) e sua distribuição geográfica	37
1.5.1 Doença de Chagas na Amazônia	38
1.5.1.1 Doença de Chagas no Amazonas	41
2. OBJETIVOS	43
2.1 Geral.....	43
2.2 Específicos.....	43
3.PRODUTO DA TESE	44
4. CONCLUSÃO.....	63
5. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PESPECTIVA	64
6._REFERÊNCIAS DA TESE	65

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana é uma enzootia de animais silvestres, originária de áreas rurais das Américas, encontrada em uma ampla faixa territorial desde os Estados Unidos à Patagônia. É uma doença causada por um protozoário flagelado de nome *Trypanosoma cruzi* e como principal forma de transmissão, o contato com as fezes de insetos hematófagos da ordem Hemiptera (família Reduviidae, subfamília Triatominae), conhecidos como barbeiros. Além da transmissão vetorial, o *T. cruzi* também pode ser transmitido por via transplacentária, transfusão de sangue, transplante de órgãos, ingestão de alimentos contaminados ou exposição acidental (1,2, 3).

A doença se manifesta em duas fases uma aguda e outra crônica, em diferentes formas. A fase aguda pode ser inaparente ou aparente. Passada a fase aguda, o indivíduo pode evoluir para a fase crônica, na forma indeterminada (assintomática) que pode nunca se evidenciar clinicamente, ou pode se manifestar na forma cardíaca, digestiva ou mista (5). Causa grave morbidade e mortalidade, e sua circulação na natureza é bastante antiga, remontando-se há milhares de anos (10).

Estima-se entre 6-7 milhões de indivíduos infectados e, aproximadamente, 75 milhões de pessoas em risco na América Latina (WHO, 2021). No Brasil, a DC é considerada um problema de saúde pública. Existem cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas, com cerca de 819.351 a 1.927.885 pessoas na forma indeterminada, entre 409.676 a 963.943 pessoas na forma cardíaca; e entre 136.559 a 321.314 pessoas na forma digestiva (6).

1.1 Agente etiológico

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, pertence ao Reino Protista, filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora ordem Kinetoplastida. (8).

Originalmente – há mais de 9.000 anos –, encontram-se evidências da presença do DNA de *T. cruzi* em múmias, exumadas no Chile e no Peru (11), sendo encontradas também em múmias sul-americanas, datadas de 4.000 anos, bem como em animais reservatórios e vetores, presentes em áreas ocupadas pelos primeiros habitantes da região (12).

No Brasil, as múmias mais antigas encontradas infectadas por este parasita, datam de 7.000 a 4.500 anos. Na Região Nordeste do Brasil foram encontradas pinturas rupestres, as quais apresentam os mais antigos registros de presença humana (Serra da Capivara, no Nordeste do Brasil), provavelmente expostos ao *Triatoma brasiliensis*, infectados durante muito tempo (13).

É um parasito de ciclo heteróximo, capaz de infectar centenas de espécies de mamíferos de oito ordens, nominados de hospedeiros ou reservatórios, e várias espécies de triatomíneos hematófagos (família Reduviidae, subfamília Triatominae) (7). Apresenta elevada diversidade genética intraespecífica e fenotípica, e possui capacidade de infectar qualquer célula, principalmente macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (15).

Além disso, um mesmo hospedeiro ou vetor pode abrigar, simultaneamente, diferentes subpopulações ou clones de *T. cruzi*. Estes clones competem entre si, sendo que dadas subpopulações são selecionadas, em detrimento de outras em hospedeiros e em áreas geográficas específicas. Diante desse cenário, atualmente, vem sendo proposto que a variabilidade de formas clínicas pode ser resultante da interação entre o pool genético do hospedeiro e o ambiente (17–19).

Devido as mudanças de hospedeiros o *T. cruzi* passa por adaptações, estabelecendo ciclos de transmissão, em diferentes nichos ecológicos e estratos florestais, os quais podem ou não se sobrepor. Cada habitat, particular em um bioma, pode apresentar diferentes espécies de animais, susceptíveis a infecção, dentro de oito ordens de mamíferos (*Artiodactyla*, *Carnivora*, *Chiroptera*, *Didelphimorphia*, *Perissodactyla*, *Primates*, *Rodentia* e *Cingulata*)(16).

1.1.1 Ciclo biológico

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida bifásico, no qual quatro formas evolutivas se alternam entre os hospedeiros mamíferos (amastigotas e tripomastigotas sanguíneas) e o inseto vetor (epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas) (20). No hospedeiro mamífero, o ciclo de *T. cruzi* se inicia quando as formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes para os vertebrados), invadem a corrente sanguínea, ao contato com fezes ou urina de triatomíneos contaminados, eliminadas próximo ao local da picada, ou alimentos contaminados. Após chegar à corrente sanguínea, estas formas podem infectar qualquer tipo de célula nuclear, via fagocitose clássica ou induzida. Em outros termos, o parasito irá penetrar células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). Nestas células, ele se transformará nas formas amastigotas, que se dividem intracelularmente por divisão binária, e se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas formas que infectam o vetor durante o repasto sanguíneo e novo ciclo se iniciará no intestino médio do inseto quando as formas tripomastigotas sanguíneas se transformam em epimastigotas, esferomastigotas e se multiplicam por divisão binária, diferenciando-se, na região posterior, em formas infectantes denominadas tripomastigotas metacíclicas (21–23)24) (Figura 1).

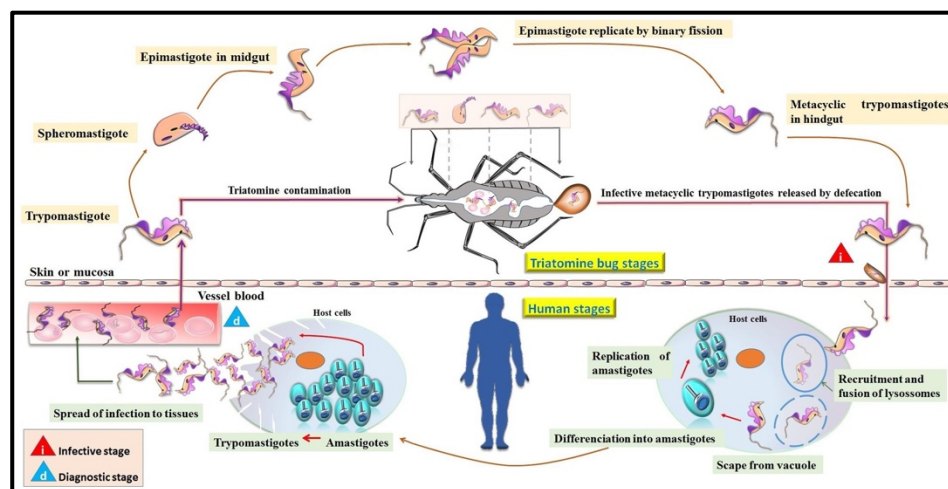


FIGURA 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A transmissão é iniciada por insetos vetores que defecam, após uma refeição de sangue, e liberam tripomastigotas metacíclicas próximos da picada. Esta fase infecciosa é caracterizada pela invasão das células do hospedeiro por tripomastigotas, formando o vacúolo parasitóforo, do qual escapam, se diferenciam em amastigotas e se replicam no citosol. Os amastigotas então dividem-se, diferenciam-se em tripomastigotas e, com a ruptura da célula, disseminam a infecção para os tecidos. Os tripomastigotas chegam à corrente sanguínea, e podem ser eventualmente absorvidos pelo inseto vetor ou infectar novas células. Nos triatomíneos, os tripomastigotas se diferenciam em esferomastigotas, tornando-se, inicialmente, epimastigotas curtos (mid-log), após a migração para o intestino posterior do inseto. **Fonte: Lidani, KC 2017**

1.1.2 Heterogeneidade genética do *Trypanosoma cruzi*

O reconhecimento do DNA, como a base molecular dos genes, remonta-se desde 1953. Entretanto, a biologia molecular, como a entendemos hoje, começou a se desenvolver no final da década de 1970, com a introdução do PCR, ferramenta fundamental para a pesquisa genética (25).

O *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional predominantemente clonal, e suas subpopulações exibem extrema heterogeneidade biológica, genética e bioquímica (17,26,27). Possui cinetoplasto, uma região especializada na matriz de sua mitocôndria única, composto por duas classes de moléculas de DNA circulares (maxicírculos e minicírculos), concatenadas e condensadas em uma estrutura em forma de disco, responsável por aproximadamente 20-25% do DNA celular (28,29). Os maxicírculos são funcionalmente equivalentes ao DNA mitocondrial de outros eucariotas, e contém genes que codificam proteínas envolvidas na respiração celular. A população de minicírculo é altamente variável entre as cepas, permitindo a diferenciação de cepas altamente relacionadas (30,31).

Em 1974, a classificação do *T. cruzi* foi baseada em suas diferenças morfológicas e biológicas, teoria proposta por Andrade (32), que agrupou a população do parasita em biotemas: I, II, III. (18). Toyé (1974), avaliando o perfil de isoenzimas gerados por dois sistemas enzimático (ASAT- aspartato aminotransferase e ALAT - alanina aminotransferase), demonstrou perfis de bandas diferenciados para os grupos analisados, confirmando assim a existência da diversidade genética nesta espécie. Utilizando Eletroforese de Enzima Multilocus (MLEE), a variabilidade do *T. cruzi* por isoenzimas foi relatada e o polimorfismo genético do *T. cruzi*, ao nível de proteínas foi descrito.

Posteriormente, diversos estudos foram realizados na tentativa de demonstrar e comprovar esse pleomorfismo genético, utilizando esse mesmo marcador, porém com número cada vez maior de *loci* avaliados, evidenciando maior número de grupos genéticos distintos nessa espécie (34,36–38).

Assim, as cepas do *T. cruzi*, isoladas de vários hospedeiros, foram agrupadas de acordo com as diferenças e semelhanças dos diversos perfis eletroforéticos de isoenzimas e classificadas em três zimodemas (Z1, Z2, Z3), por Miles(34,35).

Com o advento da biologia molecular, diversos trabalhos foram realizados utilizando a técnica da reação em cadeia da Polimerase (PCR), amplificando diferentes alvos tanto em nível do genoma nuclear como mitocondrial, do *T. cruzi*, a fim de classificar as subpopulações dessa espécie, de acordo com sua identidade genética (Ref??). Um breve histórico sobre o desenvolvimento desses marcadores é apresentando (Figura 2), iniciando com os estudos de RFLP-PCR realizados por Morel (39), seguidos pelos clássicos trabalhos de genética de populações, utilizando o RAPD e análises de isoenzimas, proposto por Tibayrenc (40) até o estabelecimento do primeiro consenso taxonômico do *T. cruzi* (41).

A fim de facilitar a comunicação entre a comunidade científica e a correlação de resultados, foi proposta a padronização da classificação de *T. cruzi* em três linhagens: *TcI*; onde foram incluídos o Zimodema 1, Tipo III, zimodemas II, II, grupo I e linhagem II; *TcII*; cepas classificadas como Zimodema 2 (42), Zimodema A (38), Tipo II (32) e Zimodema I (43); *TcIII*; cepas caracterizadas como híbridas ou cuja caracterização fosse inconclusiva devido a incongruência entre os marcadores (27).

Novas metodologias surgiram, em estudos genéticos, tais como, a análise multiloci que tinha por objetivo avaliar a diversidade genética do parasito, dando inicio as outras subdivisões posteriormente observadas no interior dessa espécie (27,37). Diante disso, uma nova proposta de subdivisão da espécie de *T. cruzi* em seis sublinhagens foi revelada (44), incluindo a DTU I, correspondente à linhagem I definida por Anonymous (41); DTU IIb, correspondente à linhagem II e às DTU(s) IIa, IIc, IId e IIe que representam os *T. Cruzii* com classificação ainda inconclusiva, quando estabelecido o consenso de 1999. Por exemplo, os IId e IIe seriam isolados e apresentam perfil híbridos e, as DTU(s) IIa e IIc, são equivalentes ao Zimodema 3, descrito por Miles (36).

Desde o final da década de 1980, avanços das técnicas moleculares para caracterização do *T. cruzi*, evidenciaram que a heterogeneidade desse parasito seria

muito maior do que os estudos bioquímicos podiam revelar, e possibilitaram estudos em um nível de detalhamento superior. A classificação do *T. cruzi* em seis linhagens (DTUs) (44), estabeleceu que Z1 e Z2 compreendiam uma DTU cada, Z3 foi dividido em duas DTUs distintas, e os isolados híbridos foram agrupados em duas outras DTUs, divisão baseada no segundo, e atualmente válido, consenso de nomenclatura, que dividiu as subpopulações de *T. cruzi* em 6 DTUs, denominadas TcI a TcVI (45). Existe ainda uma sétima DTU denominada Tcbat, descrita em morcegos, e em infecções humanas DTU (46,47) (Figura 2).

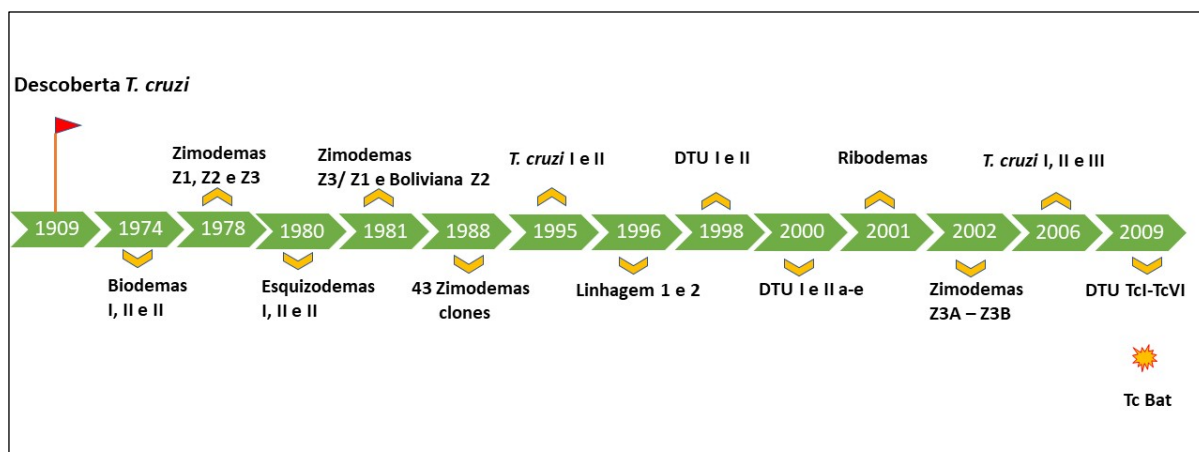


Figura 2. Cronograma das denominações de subpopulações de *T. cruzi*, ao longo do tempo, e de acordo com o método empregado. Os números representam as datas de publicação, e a estrela amarela indica consenso atual da nomenclatura e subdivisões do *T. cruzi*.

Fonte: adaptado por Laylah Magalhães 2021

De acordo com Brenière et al. (2016) vetores e hospedeiros mamíferos silvestres podem influenciar na distribuição das DTUs, havendo um equilíbrio entre genótipos e hospedeiros do parasita, provavelmente dependendo de condições ambientais como temperatura externa para vetores ou estado imunológico e nutricional para mamíferos. A diversidade de hospedeiros e as condições ambientais certamente explicariam a manutenção da diversidade parasitária e o surgimento de novas variantes por seleção natural, e que a distribuição de DTUs inevitavelmente evoluirá ao longo do tempo, principalmente se ocorrerem mudanças ambientais drásticas, como desmatamento, agricultura intensiva, urbanização e convulsões climáticas inesperadas.

Nesse contexto, os registros de local de ocorrência **das DTUs** são importantes epidemiologicamente (48), uma vez que apresentam associações ecológicas e epidemiológicas distintas, mas não exclusivas (45). Estão presentes e amplamente distribuídas nas Américas (Figura 3), com variações entre a predominância no local de ocorrência (49).

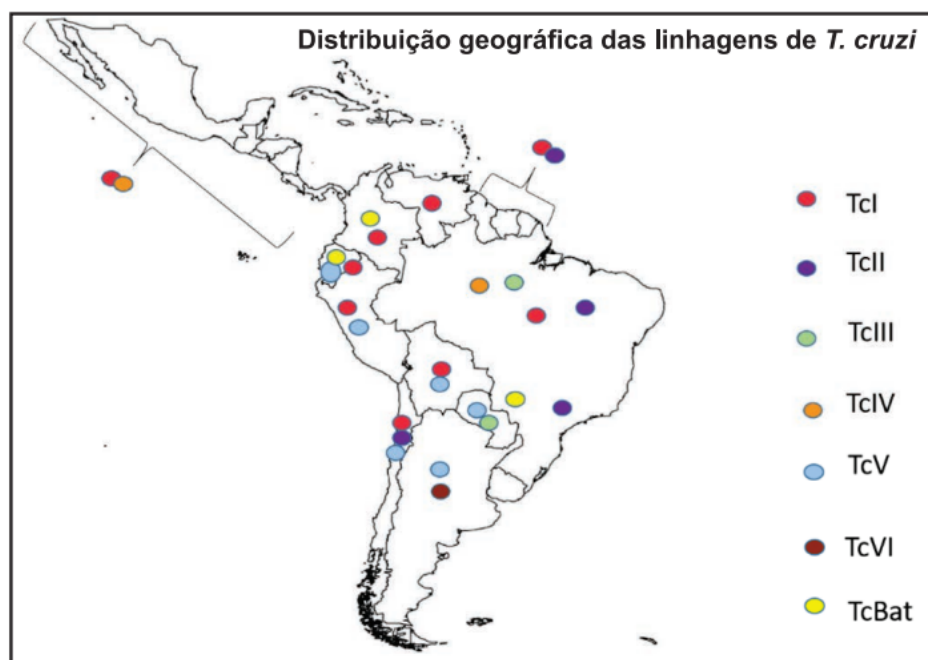


Figura 3- Distribuição das linhagens de *T. cruzi* no Brasil
Fonte: Adaptado de Zingales 2011 por Sousa et al. 2021

O registro de ocorrência espacial de *T. cruzi* e o conhecimento da DTUs circulante, contribuem para entendimento da ecoepidemiologia e desenvolvimento de estratégias para o controle e vigilância de doenças de Chagas (45,52). Alguns estudos (46, 47) mostram que TcII, V e VI estão mais associados ao ciclo domésticos nos países do Cone Sul e Bolívia, TcIII e IV são principalmente amostrados em ciclos silvestres da floresta tropical e Tcbat previamente identificado em morcegos, foi também encontrado em humanos (50). A seguir descreve-se um resumo sobre a distribuição espacial e ocorrência de ciclos das DTUs conhecidas:

DTU – TcI

A TcI tem ampla distribuição, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile; é a DTU mais frequentemente amostrada em ciclos silvestres (37,65), principalmente, em ecótopos arbóreos, entre espécies de *Didelphis* e triatomíneos (52,66), mas também é frequente em ciclos domésticos. É a DTU responsável pela doença de Chagas no norte da bacia amazônica, na Colômbia e Venezuela (62–64), também relatada na Amazônia (53–56), em pacientes com a doença de Chagas crônica (Santana et al., 2013). Pode apresentar manifestações clínicas agudas graves, incluindo cardiomiopatia (49).

Estudos moleculares empregaram diferentes marcadores demonstraram a elevada heterogeneidade de TcI (52). Em amostras da Colômbia, o TcI foi dividido em quatro grupos ou haplótipos, la a ld, que corresponderam a haplótipos de infecção humana, em triatomíneos silvestres do gênero *Rhodnius*, e no ciclo de transmissão de *T. cruzi* no ambiente peridomiciliar, associado a espécie de triatomíneo *Triatoma dimidiata* (60). O haplótipo TcIc foi observado somente uma vez (59), e um novo haplótipo (Ie) foi descrito e associado ao ciclo doméstico no Chile e ao ciclo silvestre na Bolívia, (61).

DTU- TcII

Representa é uma linhagem com ampla ocorrência nas da Américas (50,67–69), associada, principalmente, ao ciclo doméstico de transmissão de *T. cruzi*, sendo também encontrada no ambiente silvestre, em mamíferos (primatas, roedores, marsupiais, morcegos, carnívoros e em triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius* (50,67,70,71). É a linhagem associada aos casos graves de DC crônica (48) nas formas cardíaca, indeterminada ou cardiodigestiva (72).

DTU TcIII

A DTU de *T. cruzi* TcIII ocorre principalmente, em ciclos de transmissão silvestre. Tem ampla distribuição desde no oeste da Venezuela ao Chaco argentino (37,52), e no Brasil, nos biomas Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Amazônia. É

extremamente disperso, ocorre em ciclos de transmissão focais. Tem sido detectada em humanos, triatomíneos *Triatoma guasayana* silvestre, da Bolívia e *T. infestans* em ambientes domésticos do Paraguai, e em reservatórios silvestres em tatus, particularmente o gênero *Dasypus* (74,79,80), roedores caviomorfos, morcegos, quatis, gambás e carnívoros (81,82), e cães domésticos no Brasil e na região do Chaco, Paraguai, Argentina e Chile (46,83–85). A observação de heterozigose em seus isolados (75) denota indícios de que esse genótipo tenham surgido a partir de eventos de hibridização entre as DTUs TcI e TcII (73,74).

DTU TcIV

TcIV tem sido vinculada a ciclos silvestres (53,58,62), em associações ecológicas complexas que permanecem pouco compreendidas (85). Há registro de sua ocorrência em vetores, reservatórios silvestres na América Central e do Sul, com maior concentração na América do Norte (50) em isolados de migrantes bolivianos na Espanha (88). Na bacia amazônica o TcIV foi encontrado em primatas não humanos, cães e triatomíneos do gênero *Rhodnius* spp (51,58,86) e em humanos, associada aos surtos de transmissão por via oral, após consumo de alimentos contaminados, principalmente o açaí (51,53), e em casos de infecções únicas ou mistas no Brasil e em países vizinhos (53,87).

DTU - TcV e VI

Este genótipo tem surgido a partir de eventos de hibridização entre as DTUs TcI e TcII (27,73,74), devido a observação de heterozigose em seus isolados (75,89). Acredita-se que sejam originárias da região do Gran Chaco, onde são predominantes (50). Predomina em ciclos de transmissão doméstica nos países do Cone Sul da América do Sul e em hospedeiros silvestres (49,50,52). Na Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Panamá e Paraguai, foram encontradas em triatomíneos domésticos (78,90,91) e, também, em casos humanos na Argentina, Brasil e Chile (92–95) com alta taxa de infecção em migrantes bolivianos na Espanha (96). Na região amazônica foram confirmados infecções mistas em cães e triatomíneos da espécie *Rhodnius pictipes*, com TcI e híbridos (TcV/TcVI) (67).

TcBat

TcBat é uma DTU independente, geneticamente, mais próxima a DTU TcII. Solada pela primeira vez em morcegos dos gêneros *Myotis* e *Noctilio*, no estado do Mato Grosso (97), foi descrita em humanos (47), e em triatomíneos da espécie *T. sordida* (50). Considera-se que sua distribuição é mais ampla, com relatos em outros estados brasileiros, no Panamá e Colômbia (98).

1.2. Vetores - Triatomíneos

Os hospedeiros invertebrados de *T. cruzi* são insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, classificados em 5 tribos (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini), 18 gêneros, e 154 espécies (três fósseis e 151 existentes). No Brasil, há registros 65 espécies e cerca de 25 já foram registradas na Amazônia, dentre estas, 12 espécies no Amazonas: *Cavernicula lenti*, *Cavernicola pilosa*, *Eratyrus mucronatus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. lignarius*, *P. rufotuberculatus*, *Rhodnius amazonicus*, *R. brethesi*, *R. paraensis*, *R. pictipes*, *R. robustus* (Nascimento et al 2020, Souza et al., 2019, Galvão 2014).

Podem ser encontrados nas Américas, onde estão distribuídos, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, bem como na Ásia e no norte da Austrália (99). Ocupam os mais diversos ecótopos e, apesar do comportamento sinantrópico que algumas espécies apresentam, a maioria são silvestres e podem ser encontradas em locais próximos a sua fonte alimentar, em ninhos de pássaros, tocas de vertebrados, bromélias, palmeiras, sob árvores ocas ou cascas de árvores e outros ecótopos conforme revisadas por Gaunt e Miles (66).

São insetos com capacidade de adaptação em diferentes condições, toleram uma faixa de umidade em torno de 30-80% e temperaturas entre 24 e 28 °C, o tempo do ciclo de vida tende a ser maior em locais com baixas temperaturas (por exemplo, 16 °C), enquanto temperaturas acima de 40 °C são letais (106).

Triatomíneos provavelmente evoluíram de grupos de insetos predadores da família Reduviidae. Se alimentando de partes moles de animais invertebrados como lagartas, larvas e aranhas, que habitavam ninhos de vertebrados. Mais tarde, começaram a perfurar a pele de pequenos vertebrados. É possível que, na primeira fase, a hematofagia fosse opcional e, como a saliva desses insetos não possuía propriedades anestésicas, os triatomíneos teriam sido levados a se alimentar de vertebrados recém-nascidos, que seriam atacados de uma forma especial de predação. Posteriormente nesta fase, a partir das adaptações para hemólise, teria iniciado o processo hematófago (100).

A hematofagia requer o consumo de uma enorme quantidade de sangue, obrigando o inseto, a excretar de forma imediata grandes quantidades de água e sais imediatamente para reduzir seu peso. Outra adaptação à hematofagia é a ruptura eritrocítica e o processo hemolítico no início da digestão. A hematofagia obrigatória é necessária para a maturação dos seus ovos, bem como de seu desenvolvimento em todas as fases evolutivas (I - V estágio - Adulto) (Figura 4), embora já tenha sido observado o exercício do canibalismo, do predatismo e do coprofagismo (100).

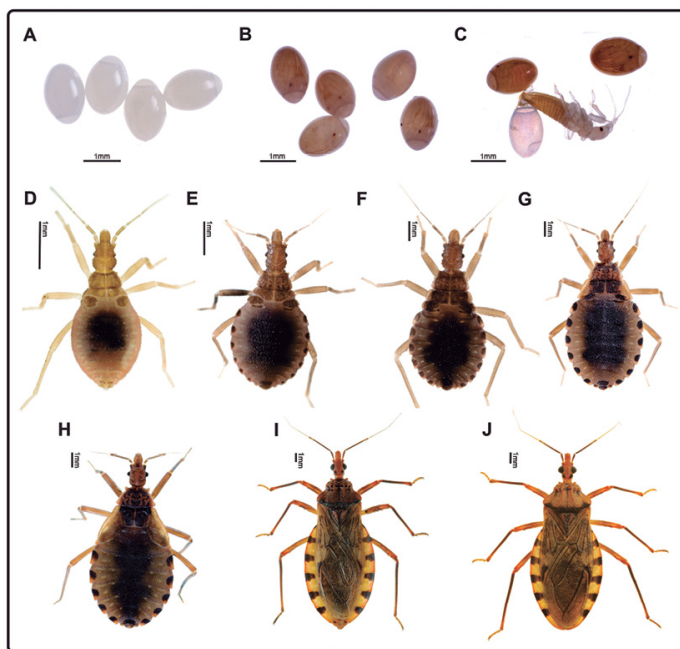


Figura 4: Ciclo de vida do *Panstrongylus geniculatus*. A Ovos ovopositados, B Ovos maduros, C: ovos eclodindo, D: Ninfa I estágio (N1), E: N2, F: N3, G: N4, H: N5, I: Adulto Fêmea e J: Adulto macho. Fonte: Vivas et al, 2021

Dos 18 gêneros conhecidos três têm importância médica por abrigarem espécies vetoras de *T. cruzi* a saber: *Triatoma* Laporte, 1832; *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Rhodnius* Stål, 1859. A identificação básica desses três gêneros é baseada na inserção das antenas na cabeça, macroscopicamente perceptível. Em *Panstrongylus*, as antenas são inseridas perto dos olhos; em *Rhodnius*, esses apêndices estão no ápice da cabeça; e em *Triatoma*, estão localizados na porção média da cabeça (102).

Os hábitos alimentares dos triatomíneos são bastante variáveis (110). Há espécies frequentemente associadas a aves, como o *T. pseudomaculata* (111); a mamíferos como o *P. megistus* (112); e outras, com maior ecletismo, com relação ao repasto sanguíneo, como o *T. brasiliensis* (113). Esse ecletismo pode proporcionar múltiplas infecções durante a vida do vetor e, conseqüentemente, a mistura de vários genótipos de *T. cruzi* (114). Espécies silvestres podem ser atraídas pela luz de ambientes domiciliares em busca de fonte alimentar representada pela presença de animais, como cães, gatos, caprinos, ovinos, entre outros. Dessa forma, o peridomicílio tem grande importância epidemiológica, principalmente por ser um intermédio entre os ambientes silvestres e domiciliar, com a possibilidade de inserção de cepas silvestres do parasito no habitat humano, facilitando a manutenção do ciclo de transmissão vetorial (109).

1.3 Palmeiras

As palmeiras são espécies de plantas encontradas principalmente nos trópicos e subtropicais (115). São conhecidos 184 gêneros e descritas 2.500 espécies (116). São um dos habitats mais comuns de espécies de triatomíneos silvestres do gênero *Rhodnius*. A ampla distribuição de palmeiras, juntamente com a sua variabilidade morfológica, desempenhando um papel importante na formação de colônias por triatomíneos silvestres, uma vez que proporcionam abrigo para diferentes espécies de mamíferos silvestres muitas vezes infectados pelo *T. cruzi* (117), consideradas indicadores ecológicos de áreas de risco para doença de Chagas (55,118,119).

Estudos recentes relataram que dentre as 38 espécies de palmeiras com copas complexas, estão os gêneros *Attalea*, *Mauricia*, *Oenocarpus* (66,117,118,120–122), as quais são encontradas frequentemente infestadas por triatomíneos. A maioria das espécies da tribo Rhodniini tem nas palmeiras seus habitats preferenciais (66).

As palmeiras do gênero *Attalea* fornecem habitat primário para as populações silvestres de *Rhodnius* em muitas paisagens florestais, rurais e suburbanas, em toda a bacia amazônica por terem copa grande (66,123). Em paisagens perturbadas, onde espécies de *Attalea* são abundantes perto das moradias, o risco da ocorrência de casos da doença de Chagas é maior (119,124,125), devido ao fato de que a alteração antropogênica podem induzir a dispersão dos insetos adultos. Ao voarem das copas das palmeiras, podem entrar nas casas, ao serem atraídos pela luz artificial (126), e dessa forma, ao ter contato com humanos podem transmitir o *T. cruzi* diretamente ou indiretamente, como por ex. por contaminação alimentar (125), demonstrando que esta possa ser a principal via de transmissão de *T. cruzi* para humanos na Amazônia. Assim, vetores de *T. cruzi* e os humanos podem estar coexistindo, em ambientes perturbados na Amazônia (131).

1.4 Reservatórios de *T. cruzi*

O papel dos reservatórios, como vias alternativas de transmissão do *T. cruzi*, tem sido discutido devido a muitos mamíferos apresentarem hábitos insetívoros e podem, eventualmente, alimentar-se de triatomíneos naturalmente infectados, desde que tais oportunidades lhes sejam oferecidas (70).

Considera-se como reservatórios aquela espécie ou conjunto de espécies que apoiam a manutenção de um parasita na natureza de forma sustentável, em uma dada escala de espaço (132). Ou seja, capazes de se infectar e manter a infecção por um determinado parasito.

Do ponto de vista ecológico, a diversidade de hospedeiros de um parasita representa um de seus componentes de amplitude de nicho ecológico, uma vez que

este reflete a diversidade de recursos utilizados (133). De uma ótica evolucionária, a diversidade do hospedeiro não é meramente uma função de quantas espécies de hospedeiros podem ser exploradas, mas, sim, em quais delas são exploradas e o quão intimamente relacionadas são umas com as outras (134).

Entre os hospedeiros vertebrados e reservatórios silvestres do *T. cruzi* estão inclusas cerca de 200 espécies de mamíferos, as quais desempenham um papel importante, principalmente devido à sua estreita relação com triatomíneos e sua proximidade com o homem (137). Os reservatórios silvestres são marsupiais, desdentados, roedores, primatas e morcegos de várias espécies. Os reservatórios domésticos são representados pelo gato, cachorro, rato, coelho e o próprio homem, e, quanto às aves e aos vertebrados pecilotérmicos (lagartos, rãs e ofídios), tratam-se de animais capazes de alimentar os barbeiros, mas que não abrigam o *T. cruzi* no organismo, não sendo, portanto, considerados reservatórios (5).

1.4.1 Ordem Didelphimorphia

A ordem Didelphimorphia, no continente Americano, tem como representante uma única família, a Didelphidae, sendo essa uma das mais antigas e importante reservatório de *T. cruzi* (80,138). Esta família conta com mais de 70 espécies, podendo ser encontrada desde o Canadá até a Argentina (139,140). De acordo com Jansen (7), os didelphídeos são, de fato, importantes reservatórios do parasito, sendo seus principais representantes os gêneros *Didelphis* e *Philander*.

O gênero *Didelphis* tem ampla distribuição na natureza, devido a sua capacidade de se adaptar a diferentes nichos ecológicos, principalmente em ambientes antropizados (141), e, por isso, é considerado um biomarcador de ambientes degradados. Esses animais são nômades, e a maioria dos machos são solitários, se refugiam em buracos e folhagem de árvores e são excelentes escaladores. São capazes de utilizar todos os estratos florestais e, com isso, estar em contato com os diferentes ciclos de transmissão de *T. cruzi* (7). Sua alimentação onívora favorece a transmissão por via oral, pela predação de triatomíneos infectados

ou de outros pequenos mamíferos. Dependendo da região, a infecção por *T. cruzi* nesses marsupiais pode variar de 11 a 90% (7,142) .

Os *Didelphis* também podem atuar como reservatórios e vetores, de uma só vez, a partir da ruptura de ninhos de amastigotas de *T. cruzi*, em tecidos de glândulas anais, que facilitaríamos a transmissão por contaminação de fluidos a outros mamíferos, ou mesmo a seres humanos. Quando estes entram em contato com ambientes enzooticos, podem contaminar os seus membros e extremidades (mãos), mucosas, utensílios e alimentos (46).

Na natureza, as cuícas *Philander frenatus* e *P. opossum* podem apresentar um papel importante na manutenção e infecção de triatomíneos, uma vez que são encontradas altas prevalências de infecção com hemoculturas positivas que podem chegar a 80% (7). Esse gênero está associado a galerias florestais, porém não apresenta comportamento sinantrópico. Ao contrário de *D. aurita*, a infecção experimental de *P. frenatus* resultou em altas parasitemias e em altos títulos de anticorpos, isso quando infectadas por ambos os genótipos TcI e TcII do parasito (143). O perfil das infecções experimentais de *D. aurita* e *P. frenatus* mostra que essas espécies podem ser responsáveis por distintas pressões seletivas para as subpopulações de *T. cruzi* e, assim, desempenhar papéis diferentes na transmissão do parasito na natureza.

1.4 2 Ordem Rodentia

Estão na ordem *Rodentia* mais de 40% das espécies de mamíferos. Embora os roedores sejam frequentemente considerados apenas camundongos e ratos, as mais de 2.000 espécies desta ordem abrangem uma diversidade impressionante de formas e comportamentos. Esta ordem é representada pelos esquilos de bolso, castores, gerbis, porquinhos-da-índia, chinchilas porcos-espinhos, capivaras, ratos domésticos e silvestres, entre outros. Os roedores são encontrados em todos os continentes, exceto na Antártica, e em todos os habitats (de desertos áridos à tundra ártica), exceto no oceano. Alimentam-se de sementes, gramíneas, cascas, insetos, peixes e às vezes escorpiões. Seu sucesso ecológico foi em grande parte atribuído à sua dieta ampla, tamanho pequeno e propensão para procriar(144).

No ambiente silvestre, os roedores compartilham alguns dos seus microhabitats com triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* (100). A infecção de roedores silvestres por *T. cruzi* é pouco reportada, o que reflete as limitações na metodologia de coleta destes animais, normalmente restrita a áreas domiciliares. Um breve exemplo disso é que a maioria das descrições de infecção por *T. cruzi* em roedores ocorrem em *Rattus rattus*, espécie sinantrópica abundante na maioria das cidades brasileiras e normalmente associada a *Triatoma rubrofasciata*(109).

Os roedores como são os principais alvos de predação, tornando-se importantes no estudo do ciclo de transmissão de *T. cruzi*, uma vez que este ciclo pode acontecer por meio da via oral (145). Além disso, atuam como hospedeiros do parasita e participam da transmissão do *T. cruzi* ao conectar os ciclos silvestre, peridomiciliar e domiciliar (146,147), transportando parasitas para habitações humanas, onde são transmitidos a humanos e animais domésticos, por triatomíneos (148).

1.4.3 Ordem Carnivora

As espécies da ordem Carnivora apresentam uma notável diversidade ecológica, tendo ocupado praticamente todos os habitats, zonas de vegetação e nichos ecológicos. Apesar de suas adaptações especiais para a predação, elas são amplamente diversas em sua ecologia alimentar (frugívoros, insetívoros e hipercarnívoros - até 70% da carne) e também em suas características, como no tamanho do corpo, área de vida, sociabilidade e atividade (149). Vale ressaltar ainda, que os carnívoros silvestres são encontrados naturalmente infectados pelo *T. cruzi* (150) devido a eficiência da rota de infecção oral do *T. cruzi* (151), podem ocupar uma posição única como bioacumuladores de parasitas e, talvez, distintos DTUs do *T. cruzi* (82).

Carnívoros silvestres como o Quati (*Nasua nasua*), a Irara (*Eira barbara*) e o Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) já foram encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi*. Alguns desses, como o quati e a irara são encontrados, tanto no solo, quanto em copa de árvores, favorecendo a dispersão do parasito entre diferentes

estratos arbóreos. Esses mamíferos apresentam, também, uma importante biomassa corporal e grande área de deslocamento, aspectos importantes para a dispersão de parasitos(109). Carnívoros de médio e grande porte são conhecidos como predadores de topo de cadeia e sua alimentação, normalmente, inclui outros mamíferos menores que podem estar infectados por *T. cruzi*. Embora a transmissão vetorial também ocorra, a via mais comum de infecção desses animais, assim como de qualquer outro predador na natureza, parece ser a via oral pela ingestão de mamíferos infectados (109).

Em regiões que apresentam triatomíneos e mamíferos silvestres, com altas taxas de infecção por *T. cruzi*, os cães costumam estar mais expostos a infecção. Por consequência, são considerados a última barreira entre o ciclo de transmissão silvestre e o ambiente doméstico antes do parasito chegar ao homem. O acompanhamento desses animais, por meio de inquéritos sorológicos pode ser um indicativo de como o ciclo de transmissão do parasito está ocorrendo em uma determinada área (145,152,153).

Os cães domésticos, foram utilizados como primeiro modelo experimental de infecção por *T. cruzi*, por Carlos Chagas. A infecção pelo *T. cruzi* é mais provável em cães do que em humanos (154,155). Isso pode ser devido às diferenças de comportamento, incluindo a afinidade do cão para consumir insetos, permitindo a transmissão oral do *T. cruzi* (156) e ao fato de dormirem mais comumente ao ar livre, aumentando seu contato com vetores peridomésticos noturnos (157). Na América do Sul, os cães têm sido usados como sentinelas para identificar áreas de transmissão ativa do *T. cruzi* e o risco de doenças em humanos(152). Com isso, estes podem desempenhar um papel importante no ciclo peridoméstico da doença de Chagas, como potenciais reservatórios e podem ser sentinelas precisas. No Amazonas, por exemplo, foi relatado um caso de um cão infectado com *T. cruzi* DTU TcIV (86).

A investigação da infecção pelo *T. cruzi* em carnívoros silvestres é essencial porque esta ordem de mamíferos exhibe uma combinação de características biológicas que se expõem a várias oportunidades de infecção pelo *T. cruzi* na natureza, entre estas: comportamento alimentar eclético, vida longa, áreas extensas, dispersas longa

distância e a capacidade de explorar estratos arbóreos e terrestres em diferentes habitats. Carnívoros de vida livre, são reconhecidos por desempenharem um papel crucial na regulação de ecossistemas (158), também podem ter um efeito importante em teias de transmissão parasitária de múltiplos hospedeiros, como a do *T. cruzi*, uma vez que se alimentam de espécies de diversos táxons (82).

1.4.4 Ordem Xenartra

Os tatus, preguiças e tamanduás são os principais representantes dessa ordem que é autóctone das Américas, e compreende, ao lado dos marsupiais, os mais antigos hospedeiros do *Trypanosoma cruzi*. A primeira descrição de reservatório silvestre desse parasito foi feita pelo próprio Carlos Chagas, em 1912, ao encontrar formas parasitárias semelhantes ao *T. cruzi* no tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), o qual ele classificou como um “depositário do agente da tripanossomíase brasileira no mundo exterior” (Chagas 1912).

Os tatus, em seus abrigos subterrâneos, são normalmente associados a triatomíneos da espécie *Panstrongylus geniculatus*, e alguns trabalhos apontam, ainda, para uma associação entre estes hospedeiros e o genótipo TcII do parasito (80). Além deste genótipo, estes animais já foram encontrados infectados por outros genótipos do tipo TcI e Z3, mostrando sua importância na manutenção de distintos ciclos de transmissão na natureza.

Estes animais apresentam uma vasta distribuição, sendo encontrados naturalmente infectados com uma prevalência de infecção, variando de 4 a 50%, desde o sul dos Estados Unidos até o Uruguai. Na Guiana Francesa, *Dasypus novemcinctus* foram apontados como importante reservatório de *T. cruzi* (159), além do tatu-galinha, outras espécies, já encontradas infectadas, são o tatu-de-rabo-mole-pequeno (*Cabassous unicinctus*) e o tatu peba (*Euphractus sexcinctus*). Importante ressaltar que, em áreas rurais, é comum o tatu peba invadir galinheiros à procura de ovos e/ou animais, aproximando-se, desta forma, do ambiente peridomiciliar, podendo infectar os triatomíneos que ali se encontram. Além destes, os Xenarthras arborícolas, representado pelas preguiças são, geralmente, associadas a

triatomíneos dos gêneros *Belminus*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (100), e algumas espécies como a preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*) já foram encontradas naturalmente infectadas. Outros representantes como o tamanduá, também já foram apontados como hospedeiros naturais de *T. cruzi*, tais como, o tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) e o tamanduá (*Cyclops didactylus*).

Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o costume das comunidades rurais, onde as preguiças, tamanduás e tatus, considerados animais de grande importância epidemiológica, são caçados e consumidos em algumas áreas do país, como na região Amazônica. Nestas áreas, a manipulação da carcaça ou a ingestão da carne malcozida de animais infectados podem constituir fontes de infecção para o ser humano.

1.4.5 Ordem Chiroptera

Chiroptera é uma ordem que contém pelo menos 1300 espécies descritas, e, além de ser a segunda maior ordem de mamíferos (atrás apenas dos roedores), constitui um quarto de toda a fauna de mamíferos existentes. Trata-se de ordem cosmopolita, ou seja, com uma vasta distribuição, registro de duas espécies nos polos e em determinadas ilhas oceânicas, com a maioria das espécies de morcegos encontradas em regiões tropicais e usados como indicadores da qualidade, biodiversidade e perturbação dos ecossistemas e devido ao seu papel ecológico, contribuem para a restauração de áreas perturbadas, sucessão secundária e restabelecimento de espécies florestais primárias (160).

Os morcegos são animais de vida longa, os quais podem conviver em colônias, com uma ou mais espécies, raramente solitários (149), sendo os únicos mamíferos que voam. No Brasil, atualmente, são conhecidas nove famílias, com 65 gêneros, 0 famílias e 174 espécies de morcegos (161).

Até o momento, são conhecidas algumas doenças associadas aos morcegos como a raiva (162); a hantavirose (163), o ebola (164) e entre tantas outras a tripanossomíase se faz presente(109,165). A infecção parasitária por *T. cruzi* nestes

mamíferos é apontada por diferentes vias, dejetos por fezes contaminativas ou por via oral, a partir da ingestão de triatomíneos infectados, demonstrando a grande importância que os morcegos, independente do seu hábito alimentar, podem assumir no ciclo de transmissão de *Trypanossoma cruzi*. Devido a tais características, são facilitadores da transmissão de agentes infecciosos na natureza. Em determinadas áreas podem ser importantes reservatórios de *T. cruzi*, devido a sua abundância e rápida adaptação ao domicílio humano, podendo apresentar elevadas prevalências de infecção.

Dentre os vários gêneros desta ordem, um exemplo de infecção por *T. cruzi* por via alimentar, as espécies *Carollia*, *Artibeus* e *Molossus*, adquiriram a infecção ao se alimentarem de *Rhodnius prolixus*, experimentalmente infectados. Já *Phyllostomus hastatus*, espécie com hábitos alimentares generalistas, adquiriu a infecção ao preda um camundongo infectado(166).

Nesse sentido, vale mencionar que, mesmo morcegos predominantemente frugívoros como *Artibeus* sp., *Carollia* sp. e *Glossophaga* sp., por alimentam-se de insetos, podem infectar-se por essa via (66,167). Dentre os gêneros que compartilham o mesmo habitat que os morcegos estão os insetos do gênero *Cavernicola* (*C. lenti* e *C. pilosa*), encontrados frequentemente em cavernas (168), e dos gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius*, encontrados em ocos de árvores. Apesar de se alimentarem de sangue de mamíferos que podem conter formas infectivas do parasito, a infecção em morcegos hematófagos raramente é documentada. Esta particularidade pode ser explicada pelo fato desses morcegos alimentarem-se preferencialmente em bovinos e equinos, dois grupos de mamíferos raramente associados à infecção por *T. cruzi* (169,170).

Um genótipo de *T. cruzi*, TcBat, descrito em 2009, foi encontrado infectando morcegos insetívoros *Noctilio albiventris* (*Noctilionidae*) e *Myotis* spp. (*Vespertilionidae*) (46), relatados, inicialmente, nos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul e São Paulo, e, atualmente no Panamá e na Colômbia (171).

Os morcegos, por serem apontados como reservatórios de doenças zoonóticas necessitam de uma atenção maior na saúde pública, bem como os insetos

vetores que estão associados ao ambiente onde esses mamíferos são encontrados (109,165).

1.4.6 Ordem Primatas

Os primatas estão altamente expostos à infecção por *T. cruzi*, com altas taxas de prevalência, descritos entre micos, saguis e macacos. Conseqüentemente, eles notadamente contribuem significativamente para a manutenção dos ciclos de transmissão enzoótica (71).

O primata sagui-estrela (*Callithrix penicilata*), foi o primeiro hospedeiro identificado por Carlos Chagas, resultante da descoberta do novo tripanosomatídeo em Lassance/MG, o qual ele batizou primariamente de *Trypanosoma minasensis* e, posteriormente, com estudos mais detalhados, o denominou de *T. cruzi* (21).

Desde então, diferentes espécies de primatas neotropicais incluídas nas famílias *Cebidae* (micos) e *Callitrichidae* (saguis) são comumente encontradas e naturalmente infectadas por *T. cruzi*. Algumas espécies de primatas não-humanos (PNH) neotropicais de vida livre são hospedeiros silvestres importantes do *T. cruzi* (70,172), a infecção natural por este parasito também é descrita em PNHs em cativeiros do Novo e do Velho Mundo, onde os vetores são encontrados (122,173–175).

Como em humanos e cães, a infecção em PNHs é caracterizada por estágios agudos, indeterminados e crônicos, com um subconjunto de animais infectados desenvolvendo cardiomiopatia letal ou, menos comumente, problemas gastrointestinais (176–178).

Nos EUA, a infecção natural por *T. cruzi* de PNH alojados em ambientes externos foi relatada desde a década de 1970 (179,180). No Brasil, um estudo envolvendo primatas não humanos, examinaram primatas endêmicos de distintos fragmentos florestais em Manaus (floresta amazônica), São Paulo e Rio de Janeiro (Mata Atlântica), investigando a infecção por *T. cruzi*. Este estudo demonstrou na Amazônia, a prevalência da infecção por *T. cruzi* foi maior nos gêneros *Ateles* (83%), *Lagothrix* (66%) e *Saguinus* (66%). Na Mata Atlântica, a infecção foi mais prevalente em animais selvagens(71).

Assim, o perfil da infecção por *T. cruzi*, em qualquer espécie de mamífero, é determinado por fatores relacionados ao hospedeiro (espécie, sexo, idade, padrão comportamental), ao parasito (tempo de geração, estratégias de dispersão, características bioquímicas e moleculares das subpopulações) e ao ambiente (estresse, coinfeccões, disponibilidade de recursos), onde ocorre a interação. A especificidade do hospedeiro é o resultado, tanto da localização quanto da amplitude multidimensional de seu nicho ecológico (135), uma vez que todos os genótipo (DTUs) do *T. cruzi* foram identificados em uma ampla gama geográfica no continente americano. Sendo assim, a análise da diversidade do hospedeiro implica no entendimento dos padrões de especificidade do hospedeiro em todo o continente, afinal, um parasita pode ser altamente específico para hospedeiros em escalas locais, e oportunistas em escalas globais, ou vice-versa(136)(70).

1.5 Doença de Chagas (DC) e sua distribuição geográfica

A tripanossomíase americana é uma doença originária da América Latina que se expandiu de áreas rurais para áreas urbanas (181), e, também, de regiões endêmicas para não endêmicas (182). Ganhou importância devido aos casos de pacientes imigrantes presentes na Espanha, EUA, Suíça, Canadá e outros países não endêmicos (47).

Segundo Schumnis (47), pessoas infectadas para a doença de Chagas, originárias de 17 países latino-americanos, deixaram seus países de origem e seguiram regiões da América do Norte, Europa, Ásia e Austrália. Devido esta migração, a doença de Chagas, que era uma doença autóctone do Hemisfério Ocidental e Continental, tornou-se um problema de saúde global. Segundo estimativas em 2006, a Austrália recebeu 80,522 imigrantes dos quais 3,8% provavelmente eram infectados com o *T. cruzi*. Além disso, no Canadá, ainda em 2006, estimou-se que 3,5% dos 156,960 imigrantes da América Latina, podiam estar infectados.

Descoberta em 1908 por Carlos Chagas que identificou o agente etiológico – protozoário que denominou de *T. cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz – bem como o inseto vetor da doença, um triatomíneo, a revelação da doença de Chagas (DC) trouxe à tona graves problemas sociais de natureza estrutural em regiões do interior do país com populações em extrema pobreza e em precárias condições de vida (183).

O II Consenso Brasileiro de DC de 2015, estimou para 21 países latino-americanos, com base em dados de 2010, que 5.742.167 pessoas estavam infectadas pelo *T. cruzi*, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes nos países da Iniciativa Cone Sul, com destaque para a Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186) (185). No Brasil, estima-se que 600.000 pessoas estejam sofrendo de problemas cardíacos ou complicações digestivas da forma crônica sintomática da doença (186).

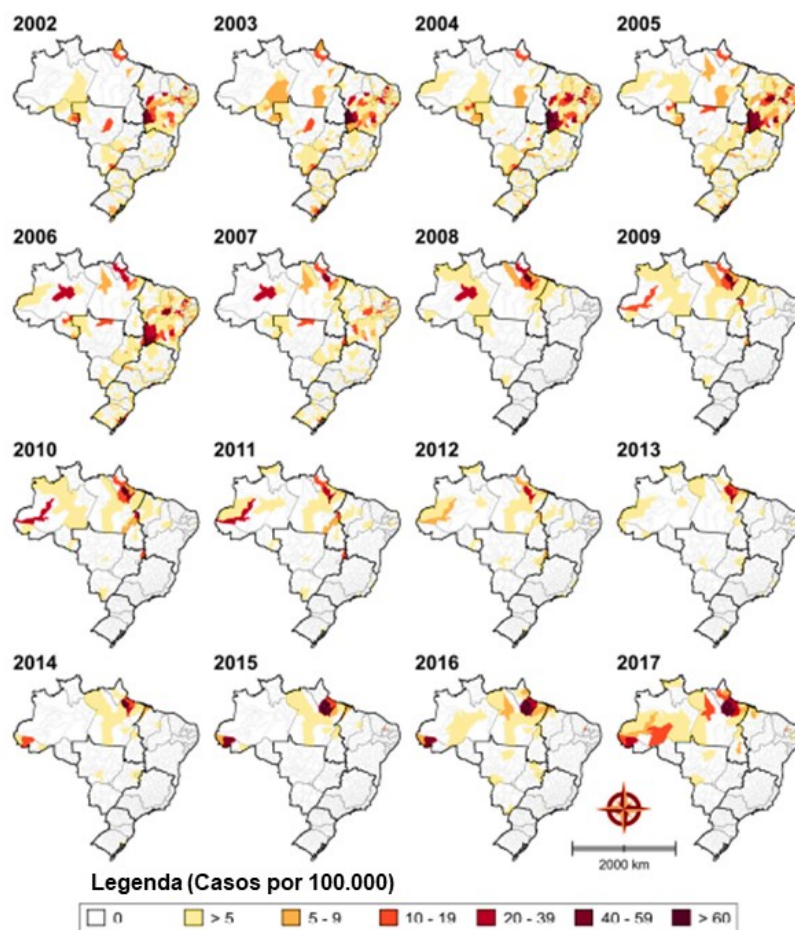
Após décadas de luta no combate ao vetor, a situação epidemiológica da doença de Chagas foi substancialmente alterada, como resultado das ações de controle e, também, em função de mudanças resultantes de transformações ambientais e de ordem econômica e social (48).

Em 2006, Organização Pan-Americana certificou o país como livre de transmissão domiciliar, pelo seu principal vetor o *Triatoma infestans*. Este fato traduziu uma redução importante da transmissão da doença no país (49).

1.5.1 Doença de Chagas na Amazônia

Em meio as diferenças regionais, ao longo do tempo, os casos de DC diminuíram significativamente em todo o país. Entretanto, observou-se uma tendência de aumento na região Norte (principalmente a partir de 2007), e reduções significativas ocorreram a partir de 2008 em todas as microrregiões, exceto na região Norte, especialmente nas macrorregiões Nordeste e Centro-Oeste. Enquanto a transmissão oral aumentou, significativamente, no Norte, durante os outros períodos (187), e na região amazônica, considerada historicamente endêmica para DCA, e

surtos na forma de microepidemias familiares são comuns em áreas urbanas e rurais (53,54,188,189).



*Figura 6: Distribuição espacial de risco relativo de DCA por microrregião, com base no número de notificações de casos (SINAN-Ministério da Economia).
Fonte: Santos et al 2020*

A doença de Chagas aguda (DAC) na Bacia Amazônica é caracterizada por ciclos de transmissão incluindo mamíferos e triatomíneos silvestres infectados com *T. cruzi*, que circulam nas proximidades da população vulnerável, pois estão em contato próximo com mamíferos domésticos e silvestres, e vetores triatomíneos. Atualmente, a maioria dos casos de DAC é causada por surtos intrafamiliares transmitidos por via oral, após o consumo de alimentos e bebidas artesanais, como o açaí e a palma bacaba (MS), descritos principalmente na região amazônica Brasileira.

Os primeiros casos agudos de DC na Região Amazônica, foram detectados por Floch e Tasqué (53) na Guiana Francesa. Na Amazônia brasileira, desde a descrição de quatro casos agudos em Belém no Pará por Shaw (54), cerca de 500 casos agudos foram relatados, a maioria nos Estados do Pará e Amapá, em microepidemias ou em casos isolados (55,56).

Entre 1975 a 1980 na realização de um Inquérito sorológico Nacional da doença de Chagas, indicou uma prevalência de 1,88% em Amazonas, o qual estima uma prevalência de 4,2% da população brasileira, com maior prevalência nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (50). Em 2008, um novo inquérito nacional foi realizado somente em crianças e registrou um caso autóctone de infecção no Amazonas de uma prevalência de 0,1% da população de crianças reativas para *T. cruzi* (51). Em 2007 a 2008, um inquérito sorológico, realizado em três municípios do Amazonas situados em áreas rurais, detectou uma taxa de 1,9% de indivíduos com sorologia positiva para a infecção pelo *T. cruzi* (52).

Em 2020, foram confirmados 146 casos de DCA no Brasil, com uma letalidade de 2% (3/146) e todos os óbitos ocorreram no estado do Pará. A região Norte apresentou a maior taxa de incidência da doença. Nesta região, a doença de Chagas apresenta características próprias e muito particulares, diferenciando-se dos padrões descritos e estudados no Cone Sul. A epidemiologia envolve uma série de determinantes biológicos e sociais, dentre eles, a migração populacional de áreas endêmicas para a Amazônia, com a possibilidade da introdução não intencional de cepas parasitárias e vetores alóctones e a intensa transformação da paisagem pelo desmatamento (60). Os fatores biológicos estão ligados à grande diversidade de reservatórios silvestres de *T. cruzi*, que resulta num intenso ciclo de transmissão silvestre. A capacidade vetorial de uma determinada espécie de *Triatominae* depende em grande parte do seu grau de associação com o homem, assim, as populações de vetores são descritas como doméstica, peridoméstica ou silvestres (61).

Devido a Amazônia apresentar uma particularidade no seu ciclo de transmissão, esforços contínuos são necessários, principalmente para manter a adaptação dos sistemas de vigilância, mais atenção e investimentos para melhorar a estratégia e tecnologia adequadas, em diferentes condições. Isso gera um alerta

precoce de risco eficaz, abordando a vulnerabilidade e criando sistemas de resiliência, implementando um sistema de vigilância de vetores, bem como inovando em pesquisa e tecnologia.

Sabe-se que, em pleno século XXI, apesar de avanços nos planos da pesquisa e do controle, imensas lacunas persistem, com a ausência de um tratamento específico eficaz e seguro para todas as fases da doença (183). Neste sentido, todas ações que visem melhorar as ações de prevenção e controle, bem como, conhecer melhor os cenários epidemiológicos da DC e sua dinâmica de transmissão, como a diversidade do parasita, as espécies vetoras e os reservatórios de *T. cruzi*, além da definição de fluxos de referência para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de complicações da doença, serão fundamentais para implementação de estratégias de controle.

1.5.1.1 Doença de Chagas no Amazonas

No Amazonas, desde 1980, registram-se casos de DC, oriundos de São Paulo de Olivença, e, de vetores, registraram-se desde 1919, com a descrição de *Rhodnius brethesi* por Matta. O primeiro relatório de um caso agudo na área urbana da capital do estado, Manaus, ocorreu em 1994, (64) já entre 1971 e 1977, foi registrada a ocorrência de triatomíneos envolvidos na transmissão de *Trypanosoma cruzi* no município e relatados casos humanos suspeitos sorologicamente oriundos do interior do estado (65–67). Em 2004, ocorreu um surto de DC na forma aguda no município de Tefé (190) em 2007, em Coari (58); em 2017, em Lábrea (53); ambos com suspeita de transmissão oral pela ingestão de açai.

Entre 2007 e 2009 foram realizadas investigações em áreas rurais de Coari, Manaus e Tefé sobre a ocorrência de vetores e reservatórios. Foram encontrados 35% dos vetores e 68% dos reservatórios positivos para TcI em *R. robustus* e *R. pictipes*. Em 2010 outro surto de DC na forma aguda foi registrado em Santa Isabel do Rio Negro (189). Barbosa em 2015 (54), organizou em ordem cronológica a distribuição dos casos de DCA no Amazonas entre 1980-2013, demonstrando que a partir do ano de 2004 houve um aumento anual de surtos de DCA, identificando que a quantidade de casos da doença pode alcançar patamares elevados.

Esses dados confirmam o que tem sido discutido, sobre os riscos da infecção chagásica tornar-se endêmica na Amazônia brasileira. Entre os fatores de risco, amplamente encontrados nas áreas rurais, está a construção das residências nas proximidades dos palmeirais ocupados por triatomíneos e marsupiais, ambos frequentemente infectados com *T. cruzi* (52,71).

Na Amazônia Brasileira existem poucos estudos sobre a variabilidade genética do *T. cruzi*, especialmente com isolados de humanos. Atualmente sabe-se que a DTU TcI é capaz de ocasionar surtos de DCA no estado do Pará (56) e TcIV no estado do Amazonas, além de TcI nos casos isolados e em pacientes chagásicos crônicos (53,191). Nesse contexto, informações disponíveis sobre a doença de Chagas neste estado reforçam as hipóteses de que a infecção chagásica ocorre em alta prevalência e em ampla dispersão como enzootia silvestre, apresentando elementos favoráveis à sua expansão como endemia humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever aspectos da bioecologia de vetores e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi*, em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e em Coari no Amazonas.

2.2 Específicos

2.2.1 Descrever a diversidade e densidade de espécies de triatomíneos e reservatórios silvestres de *T. cruzi* em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

2.2.2 Demonstrar a frequência de espécies de triatomíneos em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

2.2.3 Registrar a ocorrência de espécies de palmeiras em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

2.2.4 Identificar as espécies de palmeiras que abriguem Triatomíneos em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

2.2.5 Estimar a taxa de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos e reservatórios silvestres em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.


2.2.6 Registrar a ocorrência das linhagens de *T. cruzi* em vetores e reservatórios em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

2.2.7 Identificar a fonte alimentar de Triatomíneos em ambientes rurais, periurbanos e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

3. PRODUTO DA TESE



Bioecological aspects of triatomines and marsupials as wild *Trypanosoma cruzi* reservoirs in urban, peri-urban and rural areas in the Western Brazilian Amazon

L. MAGALHÃES¹ , H. SILVEIRA^{1,3}, S. PRESTES¹, L. K. COSTA MAGALHÃES¹, R. A. SANTANA¹, R. RAMASAWMY¹, J. OLIVEIRA², C. C. R. ROQUE², R. C. A. SILVA JUNIOR², N. FÉ², R. DUARTE⁴, M. MACIEL¹, J. ORTIZ¹, R. MORAIS¹, W. M. MONTEIRO^{1,2}, J. A. GUERRA^{1,2} and M. G. V. BARBOSAGUERRA^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Unversidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil, ²Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado, Amazonas, Brasil, ³Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade Nova de Lisboa, UNL, Lisboa, Portugal and ⁴Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Rio de Janeiro, Brasil

Abstract. In the Amazon region, *Trypanosoma cruzi* transmission cycles involve a great diversity of *Triatominae* vectors and mammal reservoirs. Some *Rhodnius* spp. mainly inhabit palm trees that act as microhabitats for hosts and vectors. The current study aimed to describe aspects of the bio-ecology of the vectors and reservoirs of *T. cruzi* in relation to human populations resident near areas with large quantities of palm trees, in rural, peri-urban and urban collection environments, located in the Western Brazilian Amazon. *Rhodnius pictipes* and *Didelphis marsupialis* were respectively the most predominant vector and reservoir, with rates of 71% for *R. pictipes* and 96.5% for *D. marsupialis*. The vast majority of *T. cruzi* isolates clustered with TcI. The most prevalent haplotype was TcI COII1 (69.7%). *Mauritia flexuosa* and *Attalea phalerata* were the main ecological indicators of infestation by triatomines. Birds were the most common food source (27,71%). *T. cruzi* isolated from *R. robustus* has the haplotype HUM-13, previously detected in a chronic Chagas patient living in the same area. Our results demonstrate the relevance of this study, with the occurrence of elevated infection rates in animals, and suggest the importance of the Amazon zones where there is a risk of infection in humans.

Key words. Chagas disease, *Didelphis*, haplotypes, *Rhodnius*, *Trypanosoma cruzi*.

Introdução

Triatomines (Hemiptera: *Reduviidae*) are insects that are popularly known as kissing bugs, and have a great impact on human health, because many species can be vectors of *Trypanosoma cruzi*, a stercoarian protozoan kinetoplastid and the etiologic agent of Chagas disease (CD) a widely-distributed, neglected tropical disease (WHO, 2019). Many *Triatominae* species live in nests, burrows and caves occupied by the vertebrates that are their food source. The odors emanating from natural hosts can help guide triatomines to their dwellings (Lazzari *et al.*, 2013). Because of their ability to infest and colonize human habitations, at least 20 species of triatomines are important vectors of *T. cruzi* (Gourbière *et al.*, 2012).

The wild, primitive habits of this group of insects are an important feature of their biology because, different from other blood-sucking insects, such as mosquitoes (Culicidae) and sandflies (Phlebotominae), where only the females (adults forms) feed on blood, all *Triatominae* stages (immature and adult), irrespective of sex, are strictly hematophagous (Lazzari *et al.*, 2013). For triatomines, hematophagy is a source of energy and nutrients (Rabinovich *et al.*, 2011). More than 200 species of mammals serve as reservoirs for *T. cruzi* (Jansen *et al.*, 2018). *T. cruzi* also establishes stable and long-lasting infections in its mammalian hosts, which display peculiarities related to different host species and even individuals of the same species. Peculiarities can include multiple factors, such as parasite subpopulations, infection routes, host nutritional status and concomitant infections with distinct *T.*

cruzi lineage (Jansen *et al.*, 2015). Most triatomine species defecate during or immediately after a blood meal, and this behaviour classifies the species as either 'good or bad' *T. cruzi* vectors, as the infective forms of the parasite are expelled in the feces of infected triatomine (Lazzari *et al.*, 2013). Host accessibility is a major factor that shapes the blood-foraging patterns of kissing bugs (Rabinovich *et al.*, 2011). The food source is fundamental for determining the vectorial potential of different triatomines and transmission scenarios in different epidemiological settings (Ribeiro Jr. *et al.*, 2015).

In the Amazon region, there is great diversity of reservoir hosts for *T. cruzi* (about 31 species in 7 orders), and at least 18 wild triatomines species have been found to be naturally infected by *T. cruzi* (Jansen *et al.*, 2018; Santos Souza *et al.*, 2019). Palm trees are a good place for birds to nest and for small mammals to live, and thus provide important habitats for some triatomine species from the genus *Rhodnius*. Approximately 387 (13.8%) of some 2800 palm species worldwide are native to the Amazon basin (Teixeira *et al.*, 2001) which is an ample refuge for vectors. Marsupials are important wildlife reservoirs of this parasitic protozoan and are an important link in the sylvatic cycle of *T. cruzi* and *Triatominae* vectors (Teixeira *et al.*, 2001).

Alteration of the rainforest environment due to human invasion and the consequent loss of natural food sources is driving triatomines towards human households, which results in increased contact with humans and subsequent numbers of acute and chronic cases of CD

(Santana *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2019).

The increase in the incidence of acute cases through oral transmission has been recorded in isolation, in outbreaks and in household micro-epidemics, by transmission through food contaminated with triatomines or through their feces (Ortiz *et al.*, 2019). Studies carried out in the state of Amazonas registered prevalence of Chagas disease of 1.9% (2008) and 2.4% (2012) and a study developed with 63 acute patients from Because of its eclectic behaviour and complex life cycle, *T. cruzi* is classified molecularly into six discrete typing units (DTUs) - TcI to TcVI (Zingales *et al.*, 2009). In the Western Brazilian Amazon, two DTUs (TcI and TcIV) were found circulating, able to cause acute and chronic infections in humans (Monteiro *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2014). Notably, the TcIV DTU was predominant among cases of acute CD and was observed in both outbreaks and isolated cases of the disease, which suggests that it has an association with different transmission frameworks (Monteiro *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2019). The current study investigated, the occurrence of triatomine vectors, reservoirs, habitat variation and patterns of vector feeding in relation to *T. cruzi* infection. In the current study, the occurrence of triatomine vectors and reservoirs, habitat variation and patterns of vector feeding in relation to *T. cruzi* infection were investigated. The objective of the study was to describe the ecological interactions with *T. cruzi* transmission in the urban, peri-urban and rural scenarios of the State of Amazonas, Brazil, in order to obtain a better understanding of the cycle of *T. cruzi* and the dynamics of transmission of CD.

retrospective cases from 2007 to 2015, demonstrated that oral transmission occurred in 75% of registered cases (Magalhães *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2019). In the last decade, numerous acute cases related to oral transmission have been recorded, with six outbreaks in the state of Amazonas (Monteiro *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2019). The DTUs of *T. cruzi* related to these cases were TcIV and Z3 (TcIII/TcIV) (Monteiro *et al.*, 2012).

Materials and methods

Study areas

This study was carried out in the municipalities of Manaus and Coari in the state of Amazonas, Brazil, in areas with a history of autochthonous cases of acute CD, with the registered presence of vectors of *T. cruzi* (Fig. 1). These areas were selected in an observational opportunistic way in forest fragments with the presence of human dwellings within their boundaries and that contained at least one hectare of forest and 10 palm trees, as stated in the experimental design. Each transect was divided into four quadrants of 25m, at least 50m from the residences. The collection occurred at different times of the year, in urban, peri-urban and rural scenarios.

In Manaus, thirty collections were performed on 10 consecutive days, in November 2007, November 2008, November 2010 and from January to June, 2012, in three different ecotopes: *Urban*: Area with heavy human intervention, changed due to urban development, characterized by packed neighborhoods and residential condominiums surrounded by disrupted forests (S 03°04'12.5" WO 60°05'30.1"). *Peri-urban*: Our peri-urban collection area

was located on the outskirts of the city and had no basic infrastructure with regards to sanitation. There is currently ongoing urban development in the area with a loss of vegetation; however rural characteristics with disrupted forest are still present. This area is located in the Tarumã district, a central-Western area of Manaus (S 03° 02' 167" WO 60°03'96"). *Rural:* Settlement with two main roads: Pau-Rosa and Cooperativa, both having several branches along with their

extension. The area contains diverse vegetation, with trees and plants of various native species (including palm trees) and cultivation for medicinal and fruit put poses. In some cases, there are small vegetable gardens and pastures, with rearing of livestock (chicken, duck, pig, goat), for the purposes of production and commercialization. A diversity of products can be found, derived from the management and extraction of biodiversity,

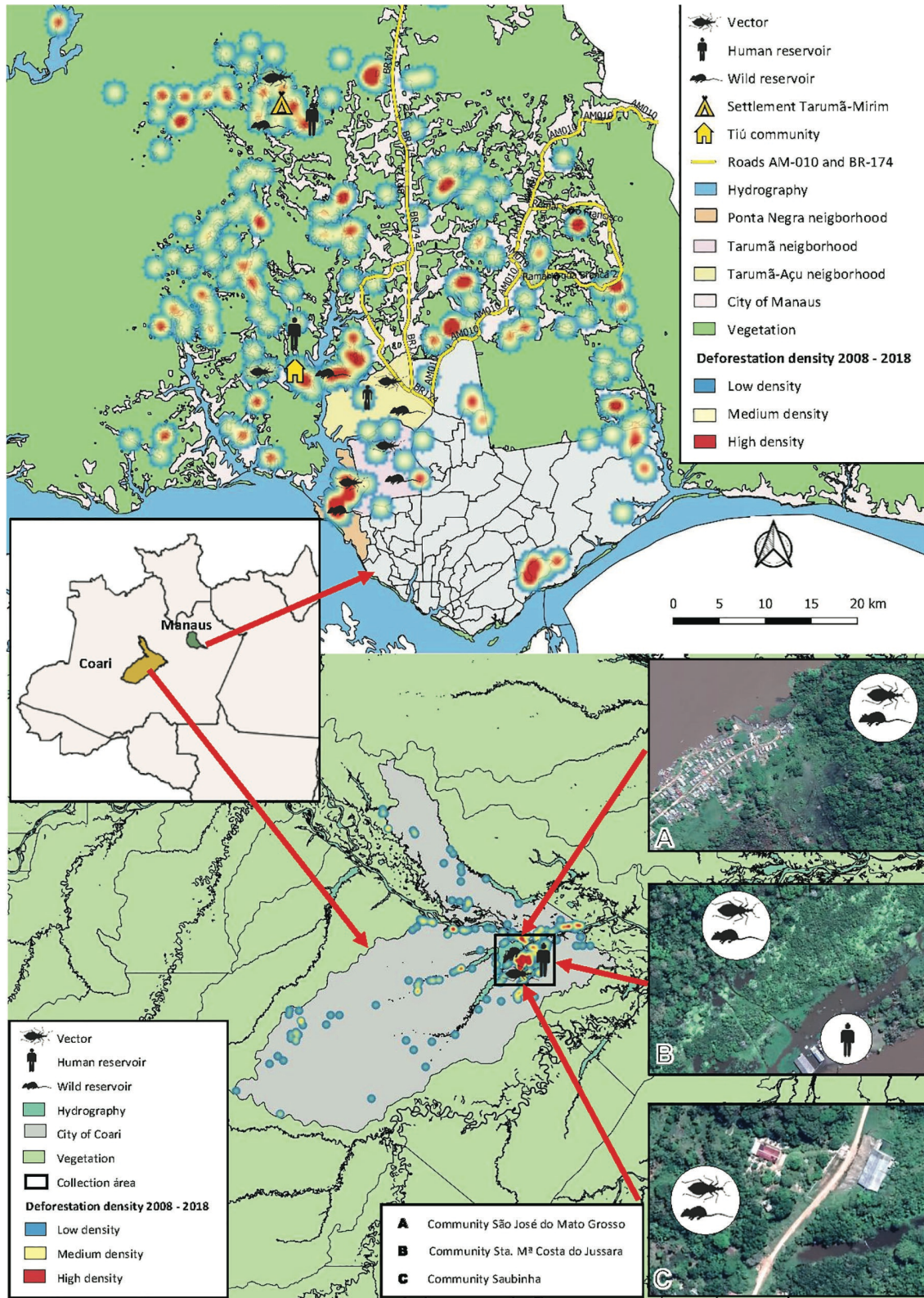


Fig. 1. Map showing locations of where the study was conducted, and indicates positive places for vectors and marsupials as hosts of *Trypanosoma cruzi*. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

whose main activity is the cultivation of the patch of land around the house, in which the inhabitants produce: cupuaçu, manioc, açai, banana, coconut, bacaba, patoá and

others. Among these goods, the most abundant are cupuaçu and manioc. It is located in an area known as Tarumã Mirim and can be reached by the BR 174 Manaus

- Boa Vista highway (Highway marker 21)(S 02°52'80.8", W 060°11'14.7") and is surrounded by the Tarumã Açu, Tarumã Mirim and Negro rivers (Fig. 1).

In Coari, samples were collected only in rural areas. A total of three collections were performed in December 2007, and March and September, 2008 in the rural communities of Saubinha, Costa Juçara, São José do Mato Grosso. Each collection lasted 10 days. The municipality of Coari (S 4° 05' 06" S, W: 63° 08' 29") is located a distance of 363km in a straight line or 463km by boat from Manaus. Access to the region from the state capital is only possible by plane or boat (Fig. 1).

Triatomine bugs collection. Triatomine vectors were captured using four Noireau traps (Noireau *et al.*, 2002), which were placed on the canopy of palm trees within a hectare of forest. Traps were examined daily for 10 days. Triatomines were also collected by the research team inside the homes of residents. Only one survey was carried out in the homes, with explanations and a demonstration provided to residents of triatomines in entomological cases. After this explanation, the residents themselves collected and delivered the insects on the collection days. All the captured insects were placed in marked collectors and brought to the Entomology Laboratory at the Doctor Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) for sorting and identification using taxonomical Keys (Lent & Wygodzinsky, 1979; Carcavallo *et al.*, 1999). Traps were examined daily for 10 days.

Selection and identification of palm tree species. The selection in each one-hectare area was made according to the phenology. After analysing the base of the palm, preference was given to those surrounded by bromeliads and bulky fronds and crowns. The traps were placed radially in the palm trees, surrounding the entire palm canopy. Based on their phenology, 3–5 traps were placed per palm tree. The traps remained for 10 days, being inspected daily, until their removal. Palm tree species were identified according to the validated keys of Khan and Corradini, and Miranda (Khan & Corradini, 1994; Miranda *et al.*, 2001).

Collection of wild reservoirs. Sylvatic mammals were collected from the same areas as the vectors. Rodents and marsupials were captured using 30 Tomahawk and 10 Sherman traps of different sizes (30×8×9cm, 45×12,5×14.5cm, 45×21×21cm, 70×40×40cm, 90×40×40cm). Traps were placed in different ecotopes: 1) close to palm trees and households, 2) underneath trees and 3) in animal shelters. Regional fruits and a paste containing slices of bacon, oat flakes, bananas and peanuts were placed inside the traps as bait (D'Andreas *et al.*, 2006) to capture small and medium-sized mammals. All of the captured animals were transported to the Department of Entomology at the FMT-HVD for anaesthesia by xylazine (2mg/kg) and ketamine (10 - 30mg/kg), applied intramuscularly, following the regulations for use of animals. Blood samples were then collected from the base of the tail or by cardiac puncture (small animals) and processed for *T. cruzi* detection. After the collection of blood, the animals were

replaced in their traps and covered with a piece of cloth to diminish light, in order to avoid stress. The animals were released 24h later at the same place where they were captured. None of the animal species captured were at risk of extinction.

Xenodiagnosis. The animals were also submitted to xenodiagnosis (XD) using *Triatoma infestans* 3th-instar nymphs reared at FMT-HVD. The triatomine fed for 30–40min, on the dorsal part of the collected reservoirs. After the blood meal, the triatomines were maintained at 27°C. After 7, 15, 30, 60 and 90days, the feces of each insect were collected and analysed microscopically for molecular characterization of their parasites.

Natural T. cruzi infection in Triatominae and reservoirs. The natural *T. cruzi* infection rates were investigated using by light microscopy in 40×. The *Triatominae* abdomen was compressed and intestinal contents were observed under a microscope for the presence of flagellated forms.

From each animal captured alive, 100µL of whole blood was transferred to 2.5mL of Novy-MacNeal-Nicolle media (NNN) and brain heart infusion media (BHI) containing rabbit blood and 40mg/mL of gentamicin sulphate. Cultures were kept at 28 °C and monitored microscopically twice a week for parasite growth, performed in triplicate for each animal. The search for flagellate forms was performed during a period of 120days via inverted optical microscopy. Unfortunately, due to logistical difficulties in implementing the methodology and in transporting specimens collected in the

field to the laboratory, some animals were not examined for infection by *T. cruzi*, mainly because they arrived dead at the laboratory.

In vitro culture of parasites isolated from triatomine feces. Feces from triatomines, both from the XD diagnosis (used in animals) and from those collected in the field, were processed for *in vitro* cultures of parasites in the same manner as described for the whole blood culture.

Parasite Identification

Extraction of total DNA. Total DNA was extracted using the commercial kit PureLink (Invitrogen®). The protocols for ‘tissue lysate’ and ‘blood lysate’ were used for vectors and mammal reservoirs, respectively. According to the life cycle stage of the insect, only a part of the body was processed for DNA extraction. For the 1st and 2nd-instar nymphs, the total abdomen was used, whereas for the 3rd-instar nymph, only the posterior half of the abdomen was processed, and for the 4th and the 5th-instar nymphs and the adults only a quarter of the posterior of the abdomen was used. For the reservoirs, DNA was extracted from cultured isolates.

Molecular characterization. Initially, parasites were genotypically characterized by amplification of the non-transcribed region of the mini-exon. For each PCR reaction, negative and positive controls were used. This method allows differentiation of *T. cruzi* into Tc1, Tc2 and Z3 or *T. rangeli*, described elsewhere (Fernandes *et al.*, 2001). Parasites were

further characterized by sequencing the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit II gene (COII) (Freitas *et al.*, 2006). DNA was amplified and PCR products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System kit (Promega®) and sequenced in both directions using the primers TcMit31 and TcMit40 (Santana *et al.*, 2014). The generated sequences derived from the sylvatic reservoirs and vectors were deposited at Genbank (Genbank: JF322831 to JF322881; JF322875 to JF322877; JN885407; JN885446; JN885450; KJ636074 to KJ636079 and KX164445 to KX164499). The sequences from the following standard strains were used for comparison: TcI (Silvio X10 cl4; EU302222.1), TcII (Esmeraldo cl3; AF359035.1), TcIII (M6241cl6; AF359032.1), TcIV (CANIII cl1; AF359030.1), TcV (Mn cl2; DQ343718.1) and TcVI (CL Brener; DQ343645.1). Phylogenetic analyses were conducted using MEGA, version 6 (Tamura *et al.*, 2013). Trees were constructed using the Neighbor-Joining method after testing for the best-fit substitution model. The bootstrap analysis was inferred based on 1000 replicates.

Blood meal sources of triatomines. The source of the blood meal was identified from a subset of collected triatomines. The material obtained by abdominal compression was analysed using enzyme-linked immunosorbent assays - ELISA (Ricardo-Silva *et al.*, 2012). Each sample was tested using 10 antisera: bird (*Gallus gallus*), goat (*Capra aegagrus*), horse (*Equus caballus*), dog (*Canis familiaris*), opossum (*Didelphis marsupialis*), cat (*Felis domesticus*), human (*Homo sapiens*),

reptile (*Tupinambis merianae*), rodent (*Rattus norvegicus*) and armadillo (*Dasypus novemcinctus*).

Ethical issues. This project was approved by the Ethics Review Board concerning the use of animals at the FMT-HVD under the approval numbers nº 0039682016.008 and nº 0039692016.009. Capture and handling of the animals were performed according to the laws of the Brazilian Institute for the Environment (IBAMA/SISBIO) and permission for the use of captured animals was obtained from IBAMA/SISBIO under approval numbers: 12364-1, 12364-2 and 12364-3. The authorization was valid for the whole of the national territory and none of the animal species collected was on the IBAMA prohibited capture list.

Data analyses

Data analyses were performed using Stata/MP 13.0. Pearson's chi-square test (χ^2) was used to compare groups, was applied to evaluate infection by *T. cruzi* which occurred while in palm trees, or from reservoirs and vectors. Results are presented in tables of absolute and relative frequencies. We assumed a confidence interval of 95% (CI 95%, $P < 0.005$) for all statistical tests.

Results

A total of 262 *Triatominae* were collected, 222 (84.7%) in Manaus and 40 (15.3%) in Coari; the highest triatomine presence was observed in urban areas 133 (51%); 252 (96.0%) specimens in five palm trees species, and 10 (4.0%) inside houses.

Four species of triatomine were detected (Table 1): *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus* and *Eratyrus mucronatus*. The species with the highest presence was *R. pictipes* with 184 (70.0%) ($P < 0.001$).

Of the general total at specimens, in the adult stage represented (39/262) 15.0% of this number; (20;7.5% *R. pictipes*, 12;5% *R. robustus*, 5;2% *P. geniculatus* and 1;0.5% *E. mucronatus*); and 223 instar nymphs in stages I-V of two species (*R. pictipes* 164;73.5% and *R. robustus* 59;26.5%) were collected with palm trees representing 85.0% ($P < 0.001$).

Species abundance and density of palm trees and triatomine

A total of 273 palm tree specimens of 10 different palm species (Fig. 2) were set with 1147 Noireau traps. A total of 252 triatomine specimens at different developmental stages were collected on five of the palm tree species studied (Tabela 1). Maximum triatomine density was observed on *M. flexuosa* (151, $P < 0.001$), and the *Attalea* genus (89, $P < 0.005$). Interestingly, the percentage of occurrence was higher in the urban area, 51% (133, $P < 0.001$).

Natural *T. cruzi* infections of vectors collected on palm trees and inside houses

T. cruzi infection was investigated in 248 (94.6%) triatomine specimens (palm tree, 238; indoors, 10) and 93(37.5%) were found to be infected. By species, the infection rates were as follows: *R. pictipes* (66; 71%) and *R. robustus* (22; 23.6%); *E. mucronatus* (1;1.1%) and *P. geniculatus*

(3;3.2%). There was a difference in the infection rate among collected triatomines. When samples were subdivided by their respective areas, differences in infection rates were also observed in the wild cycle (50% in rural settings, 9.0% in peri-urban areas and 41.0% in urban areas) (Table 1). The highest infection rates were observed for *R. pictipes* and *R. robustus* found on the *M. flexuosa* palm tree (39;42%). In the urban area (38;40%) on the *M. flexuosa* palm tree; in the peri-urban area (7;7.5%) of *T. cruzi* positive triatomines were collected from *A. maripa* and (22;23.6%) in the rural area, respectively. On *A. phalerata*, *A. murumuru* and *O. bacaba* palm trees, the infection rates were 11;12%, 3;3.2% and 4;4.3%, respectively (Fig.2; Table 1).

Table 1. Triatomine species and natural of *Trypanosoma cruzi* infection per area and general total.

Collect Palm tree	Total	Urban			Periurban			Rural			Stage		Infected		P value
		N	Inf	%	N	Inf	%	N	Inf	%	Nymph	adults	N	% inf.	
<i>Rhodnius pictipes</i>	182	83	22	26,5	19	5	26,3	80	37		164	18	64	35,2	P <0.001
<i>Astrocaryum murumuru</i>	5	—	—	—	—	—	—	5	2	40	5	—	2	40	
<i>Attalea maripa</i>	51	—	—	—	14	5	35,7	37	21	56,8	50	1	26	51	
<i>Attalea phalerata</i>	29	—	—	—	—	—	—	29	10	34,5	29	—	10	34,5	
<i>Mauritia flexuosa</i>	91	83	22	—	5	—	—	3	—	—	75	16	22	24,2	
<i>Oenocarpus bacaba</i>	6	—	—	—	—	—	—	6	4	66,7	5	1	4	66,7	
<i>Rhodnius robustus</i>	70	50	16	32	5	3	60	15	3	20	59	11	22	31,4	P <0.001
<i>Astrocaryum murumuru</i>	1	—	—	—	—	—	—	1	1	100	—	1	1	100	
<i>Attalea maripa</i>	6	—	—	—	3	2	66,7	3	1	33,3	3	3	3	50	
<i>Attalea phalerata</i>	3	—	—	—	—	—	—	3	1	33,3	3	—	1	33,3	
<i>Mauritia flexuosa</i>	60	50	16	32	2	1	50	8	—	—	53	7	17	28,3	
Total	252	133	38	28,6	24	8	33,3	95	40	42,1	223	29	86	34,1	
Collect Indoors															
<i>Eratyus mucronatus</i>	1	—	—	—	—	—	—	1	1	100	—	1	1	100	
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	5	—	—	—	—	—	—	5	3	60	—	5	3	60	
<i>Rhodnius pictipes</i>	2	—	—	—	1	1	100	1	1	100	—	2	2	100	P <0.001
<i>Rhodnius robustus</i>	2	—	—	—	—	—	—	2	1	50	—	2	1	50	
Total	10	—	—	—	1	1	100	9	7	77,8	—	10	7	70	
Total general	262	133	38	28,6	25	9	36	104	47	45,2	223	39	93	35,5	

The p-value refers to the analysis of the total data of the species *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* by species of palm trees.

Vector foods source

The food source was identified in 38 out of 126 (30%) triatomines investigated. Although horse, goat, opossum, armadillo, rodent, reptile and human blood were detected, bird was the most common food source (23; 60,5%) and was collected on *Attalea maripa* palms, *Attalea phalerata* (2), *Oenocarpus bacaba* (2) *Mauritia flexuosa*

(10). Human blood was observed in one *P. geniculatus* which was collected indoors and was infected by *T. cruzi* (Table 1; Fig. 2).

Sylvatic reservoirs

We also collected 104 wild mammals, which were found close to the dwellings, in the urban, peri-urban and rural areas where the

study was conducted, of which, 55 (53%) were collected in peri-urban areas, 38(36%) in rural areas and 11(10%) in urban areas. Four genus and two species were identified: *Didelphis marsupialis* (90;86%), *Philander opossum* (5; 5%), *Proechmys* sp. (7;6%) and *Marmosa* sp. (2;2%) (Table 2). Due to the logistics, it was not possible to examine all the animals, therefore samples were collected for culture in 97/104 (93.2%), and for xenodiagnosis (XD) in 91/104 (87.5%). Using culture methods, *T. cruzi* infections were detected in 49/97 (50.5%) (47/86; 54.6% in *D. marsupialis* and 2/5; 40.0% in *P. opossum*) and 45/91 (47.3%) by XD, (44/85; 51.7% in *D. marsupialis* and 1/5; 20.0% in *P. opossum*). The highest infection rates by culture (6/11; 54.5%) were observed in *D. marsupialis*, which were collected in urban areas (Table 1). The DTU identified was TCl (Fig. 2).

Circulating *T. cruzi* DTU in vectors and reservoirs

T. cruzi isolates COII gene sequences were obtained from 61 triatomines and 53 mammal reservoirs. Phylogenetic analysis of COII sequences generated from these isolates clustered mostly with DTU TcI, and five with DTU TcIII/IV. Seven haplotypes were detected for TcI (Fig. 2). All showed some differentiation from Silvio X10 cl4 with a bootstrap of 62%. The most prevalent haplotype was TcI COII1 (69.7%). DTU TcIII/IV- haplotype TcIII/IV_COII5 was observed in one *P. geniculatus* collected indoors (Table 1; Figs 2 and 3).

Discussion

We present data that show a high rate of natural infection by *T. cruzi*, which was

detected in four species of triatomines and in two synanthropic mammal species. These findings evidence their participation in the *T. cruzi* cycle in the urban, peri-urban and rural areas where the current study was conducted. This clearly indicates the population's vulnerability to infection by *T. cruzi*, since, in these same areas, seroprevalence studies were carried out for chronic Chagas infection in the same locations in 2008 and 2012, identifying a prevalence of 1.3% and 2.4%, respectively (Magalhães *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2014; Magalhaes, 2015).

The *T. cruzi* sylvatic transmission cycle is complex and each ecotope should be considered as a unique system by all programs which include managing of the sylvatic environment (Jansen *et al.*, 1999). In different regions of the Amazon, the scenarios of transmission dynamics have their own specific characteristics and eco-geography (Pinto Dias *et al.*, 2015) and therefore provide a wide range of potential vectors for *T. cruzi* transmission (Miles *et al.*, 1983; Ricardo-Silva *et al.*, 2012).

Palm trees are important ecotopes for triatomines, and have great importance in Chagas disease epidemiology. Their association among species of triatomines, parasites and a vertebrate host may lead to a high probability of *T. cruzi* transmission to humans who know little about CD and its transmission. Thus, the population is at high risk of *T. cruzi* infections in areas where there is a high density of palms trees (Fé *et al.*, 2009; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Abad-Franch *et al.*, 2015).

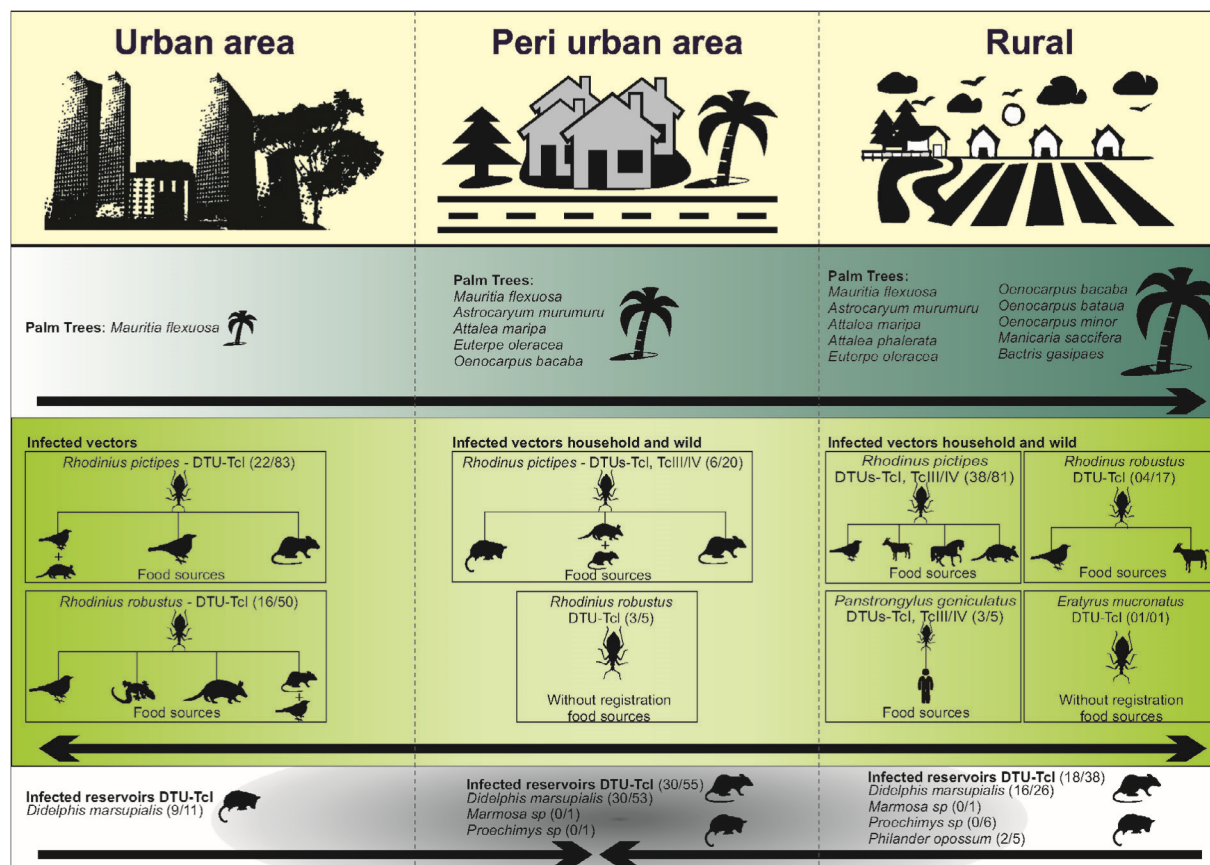


Fig. 2. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* found in an urban area, periurban and rural: diversity of palm species, vectors, wild mammals and food sources. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

Table 2. Reservoirs species and natural rate of *Trypanosoma cruzi* infection general total.

Reservoir	Total	Urban			Peri-urban			Rural			Peri/Rural/Urban	
		N	Infected	%	N	Infected	%	N	Infected	%	N	%
<i>Didelphis marsupialis</i>	90	11	9	81,8	53	30	56,6	26	16	61,5	55	61,1
<i>Marmosa sp</i>	2	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—
<i>Philander opossum</i>	5	—	—	—	—	—	—	5	2	40	2	40
<i>Proechimys sp</i>	7	—	—	—	1	—	—	6	—	—	—	—
Total	104	11	9	81,8	55	30	54,5	38	18	47,4	57	54,8

CD vectors are insects typically found in a wide range of sylvatic environments which are frequently associated with several wild vertebrate hosts, possibly in the nests, burrows and caves occupied by their vertebrate hosts, as well as in human habitations themselves. Contact with humans occurs when humans enter

forested areas or when the vectors reach urban areas by flying and colonize human dwellings (Lazzari *et al.*, 2013).

The discovery of infected triatomine species indoors, and the fact that at least five palm trees were found colonized by two triatomine species draw attention to the dynamics of the cycle of the parasite. The genus *Rhodnius* has a wide spatial

distribution that coincides with the occurrence of palm trees (Teixeira *et al.*, 2001; Abad-Franch *et al.*, 2005, 2015), and in the Amazon region *R. pictipes*, which is an important triatomine disseminator of *T. cruzi* (Miles *et al.*, 1983; Teixeira *et al.*, 2001; Valente

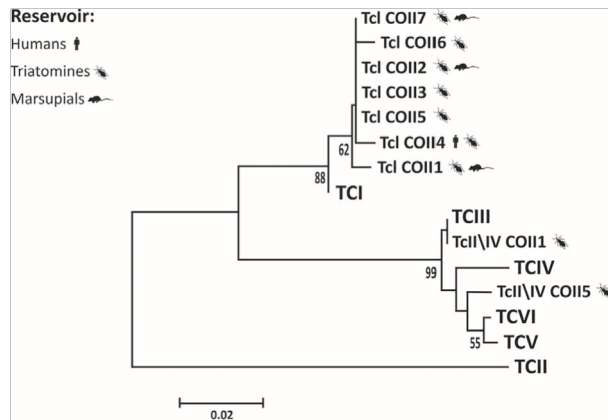


Fig. 3. Representation of *Trypanosoma cruzi* haplotypes identified as DTU TcI identified by sequencing of the cytochrome oxidase subunit II gene. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method with parameter distances using Tamura 3-parameter model included in MEGA V6 [26] software. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown below the branches whenever higher than 50%. As following standard strains were obtained from GenBank (DTU (strain name access number) were used: TcI (Silvio ×10cl4 – EU302222.1) TcII (Esmeraldo cl3 – AF359035.1) TcIII (M6241 CL6 – AF359032.1) TcIV (CANIII cl1 – AF359030.1), TcV (Mn cl2 – DQ343718.1) and TcVI (CL Brener – DQ343645.1) (Haplotypes were obtained from present and previous studies).

et al., 2009; Hiwat, 2014), is a generalist, which can be found in more than one genus of palm tree (Abad-Franch *et al.*, 2005). In this study, *R. pictipes* was found on four genus and five species of palm tree. *M. flexuosa* was the only palm tree registered in the urban area of Manaus with ample distribution and is considered the most common palm tree in the Amazon (Khan & Corradini, 1994). It has phenotypic characteristics, such as the accumulation of organic matter and epiphytes at the top of the trees, which constitutes a shelter for a

rich fauna of vertebrate and invertebrate animals, including triatomines (Abad-Franch *et al.*, 2005; Fé *et al.*, 2009; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012). Therefore, *M. flexuosa* can be considered an important indicator of the presence of this vector (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Abad-Franch *et al.*, 2015).

Of the four species of vectors found inside households, *P. geniculatus* deserves attention as it had fed on human blood and was infected with *T. cruzi*. Furthermore, this species has been previously associated with cases of Chagas disease in the Amazon region. In the region, colonization of houses by triatomine is not common, this species was found inside homes and in sleeping rooms in Venezuela and Bolivia (Carrasco *et al.*, 2014; Rojas-Cortez *et al.*, 2016), and in several wild and peri domestic ecotopes, with incursions into human homes, previously associated with cases of CD in the Amazon region (Valente *et al.*, 1998), thus presenting potential domestic adaptation (Valente *et al.*, 1998). These sporadic presence of triatomines species in these environments indicates which areas should be monitored, for possible home invasions.

In the Amazon, CD vectorial transmission routes are not known because colonization inside house by triatomines has not yet been encountered. Therefore, the probability of vectorial contact is low, and vectorial transmission is accidental. The oral transmission route of *T. cruzi* to humans causes the most cases of acute Chagas disease (ACD), due to the consumption of contaminated foods, especially açai juice and particularly in Amazonas State (Barbosa *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2019). In the current study

triatomine colonies were recorded for *Oenocarpus bacaba*, another species of palm whose fruit is also widely consumed in the region as a fruit juice. Ironically, no triatomines were found in açai palm trees (*Euterpe precatoria*). In this way identification of the food source, together with identification of ecological factors, can determine risk areas for CD and help us to understand *T. cruzi*-vector interactions.

For better understanding of the *T. cruzi* epidemiology and how it circulates among mammalian hosts, it is important to describe triatomines blood-feeding patterns across vertebrate hosts (Rabinovich *et al.*, 2011). In the study by Jansen *et al.* (2020), the author reports the most didactic and clear definition of what a reservoir is, in that it does not refer to the number of species or the ability to cause or not to cause damage, but defines a reservoir as one animal species or a set of animal species responsible for maintaining the parasite in the wild. This set of animals will be different for each location and time scale. In the current study, the main food source of the triatomines (which were collected on palm trees) was birds (a refractory animal for *T. cruzi*), found in all areas, as well as the armadillo, which probably results from the predominance of these vertebrate in these ecotopes (Teixeira *et al.*, 2001; Ricardo-Silva *et al.*, 2012). In the rural area a unique variety of food sources (horse, human and caprine) was observed when related to other areas (Valença-Barbosa *et al.*, 2015). Although our methodology was one of the limiting factors, as we did not use antisera from wild animals existing in the region, these findings could answer a previous question about the fresh food sources of these insect vectors.

The high rate of infection observed in *D. marsupialis* and *P. opossum* could indicate the exposure of these wild mammals to the *T. cruzi* transmission cycle and the potential of these hosts to infect more vectors of the parasite (Roque *et al.*, 2013; Cantillo-Barraza *et al.*, 2015; Jansen *et al.*, 2015). The interaction of *T. cruzi* with marsupials, considered to be the most important and probably the most ancient reservoirs (Jansen *et al.*, 1999). In a review article in 2020, it reports that the species *D. aurita* maintains high parasitemias by DTU TcI but not by DTU TcII in contrast to another didelphid marsupial species, *Philander opossum*, that responds with high parasitemias when inoculated with DTU TcII (Jansen *et al.*, 2020). Although this species was found in our studies, it presented TcI infection, species associated with gallery forests and can be found in terrestrial and arboreal strata and *D. marsupialis* is an abundant synanthropic mammal, and is considered to be the main reservoir of *T. cruzi* in places characterized by a high degree of human disturbance (Roque *et al.*, 2013).

Jansen *et al.* (2015) found 58% of *T. cruzi* isolates from Brazilian sylvatic mammals to be TcI whereas 17% were TcII. Since *D. marsupialis* is a vertebrate animal that allows the development of the two multiplication phases of the *T. cruzi* life cycle (Lenzi *et al.*, 1984), their constant presence in the vicinity of human houses may establish a link between the wild and home environments and thus favour the establishment of human infections. These marsupials normally present a high rate of natural infection when tested (Cantillo-Barraza *et al.*, 2015; Jansen *et al.*, 2015).

In the current study, *T. cruzi* TcI and TcIII/IV haplotypes were detected in vectors. However, other parasites can be found in *Rhodnius*, such as *T. rangeli*, which is common in this genus (Miles *et al.*, 1983). In the current study, to avoid a false positive result, in addition to readings such as optical microscopy and application of the Fernandes *et al.* (2001), methodology, which differentiates this parasite, we sequenced the samples and were able to pair them with reference strains of *T. cruzi*, inserted in the GenBank. Thus, we found that one of these lineages, confirmed by its haplotype previously registered in the Amazon, has been implicated in both CD outbreaks (Valente *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2019) and chronic infections, indicating that humans are not spared within the transmission cycle.

T. cruzi TcI isolates were predominantly associated with the sylvatic transmission cycle from different regions of the Amazon (Zingales *et al.*, 2009). This DTU was considered homogenous. However, recent studies using different genetic markers on vectors and wild and human reservoirs in several countries have revealed that this group retains large heterogeneity (Herrera *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2012; Rivera *et al.*, 2015).

In the present study, *T. cruzi* COII gene sequences showed seven haplotypes, and there was no association with specific areas (rural, peri-urban or urban), as described by Herrera *et al.* (2009) for the different cycles (sylvatic, peridomestic and domestic). Diversity was greater in rural areas (seven haplotypes versus two haplotypes); a trend similar to that observed by (Rivera *et al.*, 2015), who suggest that a richer diversity of palm trees may determine the diversity of

vectors and/or reservoirs and, subsequently, a more diverse parasite community. In general, the genetic structure and complex evolution of TcI strains would be the result of adaptation of the strains to many species of mammals whose dynamics and geographical distribution in the Americas have been conditioned by paleogeographic and climate changes (O'Connor *et al.*, 2007; Roque *et al.*, 2013).

Phylogenetic analysis of COII gene sequences has shown that all isolates from humans, wild reservoirs and vectors differentiate into two major clades that could be associated with the DTUs TcI and Tc III/IV. Furthermore, the seven TcI haplotypes were associated in the two clades, one that aggregated all but one haplotype (TcI COII4). In this study, it is the second clade that clusters *T. cruzi* isolated from *R. robustus* (TcV28D) and reinforces that this haplotype (HUM-13) is circulating in the region, since it has already been detected in a chronic CD patient from the same geographic area (Santana *et al.*, 2014). This demonstrates that CD transmission is occurring in the area and *Rhodnius* are the potential primary vectors in this *T. cruzi* transmission cycle.

In the Amazon region, *T. cruzi* was first detected in the early twentieth century in non-human primates, and the first human case of Chagas disease was registered in French Guiana (Floch & Tasque, 1941). In the Brazilian Amazon, acute human Chagas disease (CD) cases were detected in 1969 in Belém, Pará State (Shaw *et al.*, 1969). Currently, *T. cruzi* infections are reemerging as an important health problem; new cases have appeared and have raised alerts regarding the possibility of endemicity of this disease (Coura & Junqueira, 2012;

Barbosa *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2019). In the same rural area in Manaus and Coari, studies showed that 1.3% and 0.5% of individuals presented *T. cruzi* antibodies (Magalhães *et al.*, 2011). In 2007, the second acute CD outbreak in the Amazonas state was registered in Coari, and the DTU TcIV was identified (Monteiro *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2015). *T. cruzi* DNA was found in triatomines used for xenodiagnosis of patients with positive serology for chronic CD, and DTU TcI was the detected strain (Santana *et al.*, 2014). The above indicates that a transmission cycle is taking place in these areas and has increased the discussion regarding the urgency of establishing surveillance measures to combat CD in the Amazon. In 2015, the Amazon was included as an endemic area for CD in Latin America (Pinto Dias *et al.*, 2015).

Conclusion

In the current study, we found a high rate of infections by *T. cruzi* in adult triatomine species collected indoors (one had a human blood meal in its midgut) and in all triatomine stages found in palm trees, as well as synanthropic reservoirs collected in urban, peri-urban and rural of Amazonas state.

T. cruzi transmission risk depends largely on the natural infection rate of vectors and reservoirs. The information herein reinforces this concept. This study showed a high rate of infection in vectors and wild reservoirs collected in different species of palm trees and areas with different geographic characteristics. The presence of infected vectors inside homes may not yet be the harbinger of CD domiciliation

in the Amazon, but it does indicate a real threat in the transmission of Chagas disease to this population.

Health agencies must carry out education, focusing on guidance on the importance of triatomines and marsupials in the *T. cruzi* transmission cycle, so that the population can exercise preventive measures to minimize the chances of acquiring CD.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz-Escola Nacional de Saúde Pública and the Municipality of Coari for the facilities provided in order to accomplish the present study. We also thank all the people who helped during the implementation of the methodology in this study and to Matthew Miller, for reviewing the text in English. This work was supported by the Amazonas Research Foundation (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas –FAPEAM) (PPSUS grant call for proposals no. 007/2009), by the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), and by the Department of Science and Technology of the Ministry of Health of Brazil (Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde do Brasil DECIT/MS).

There are no relationships or support that might be perceived as constituting a conflict of interest and the material is original and has not already been published.

Authors contributions

Collected: LKCM (Laylah), SRP, LKCM (Laise), CR, JCO, MM, RCA Silva-Junior, NF and RAGS. Serological tests (Food source): RD and LKCM (Laylah). Parasitological tests: LKCM (Laylah), SRP and RC Silva-Junior, JCO. Graphic Art: RM. Molecular techniques: HS, LKCM (Laylah), SRP and RR. Data analysis: LKCM (Laylah), RR, JO and MGVBG. Wrote the paper: LKCM (Laylah), HS, JAOG, WMM and MGVBG. All authors read and approved the final version of the MS.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Abad-Franch, F., Palomeque, F.S., Aguilar, V.H.M. & Miles, M.A. (2005) Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, *Triatominae*): Risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Tropical Medicine & International Health*, **10**, 1258–1266.
- Abad-Franch, F., Lima, M.M., Sarquis, O., Gurgel-Gonçalves, R., Sánchez-Martín, R. *et al.* (2015) On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. *Acta Tropica*, **151**, 126–141.
- Barbosa, M.d.G.V., Ferreira, J.M.B., Lima, A.R.A. *et al.* (2015) Review Article Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **48**, 27–33.
- Cantillo-Barraza, O., Garcés, E., Gómez-Palacio, A. *et al.* (2015) Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: *Reduviidae*), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasites & Vectors*, **8**, 482.
- Carcavallo, R., Giron, I., Jurberg, J., & Lent, J. (1999) *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas*, Fiocruz. ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, Fiocruz Editorial; 1997. 733 p. ilus.
- Carrasco, H.J., Segovia, M., Londoño, J.C., Ortegoza, J., Rodríguez, M. *et al.* (2014) *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasites & Vectors*, **7**, 1003–1028.
- Coura, J.R. & Junqueira, A. (2012) Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**, 145–154.
- D'Andreas, O., Jansen, A., Bezerra, C., Roque, A., Teixeira, B., *et al.* (2006) Relatório de atividades: avaliação do ciclo de transmissão silvestre do *Trypanosoma cruzi* na área de ocorrência do surto de doença de Chagas em Redenção/CE—Levantamento faunístico e diagnóstico da infecção. Secretaria de Saúde, Fortaleza, p. 125.
- Fé, N.F., Magalhães, L.K., Fé, F.A., Arakian, S.K., Monteiro, W.M. & Barbosa, M.D.G.V. (2009) Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **42**, 642–646.
- Fernandes, O., Santos, S., Cupolillo, E., Mendonça, B., Derre, R. *et al.* (2001) A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**, 97–99.
- Floch, H. & Tasque, P. (1941) Un cas de maladie de Chagas en Guyane Française. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, **40**, 36–37.
- Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V.F. *et al.* (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, **2**, e24.
- Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F. & Dumonteil, E. (2012) Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. *Heredity (Edinb)*, **108**, 190–202.
- Gurgel-Gonçalves, R., Cura, C., Schijman, A.G. & Cuba, C.A.C. (2012) Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: *Reduviidae*), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. *Acta Tropica*, **121**, 105–111.
- Herrera, C., Guhl, F., Falla, A. *et al.* (2009) Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *Journal of Parasitology Research*, **2009**, 1–9.
- Hiwat, H. (2014) *Triatominae* species of Suriname (Heteroptera: *Reduviidae*) and their role as vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **109**, 452–458.
- Jansen, A.M., Santos De Pinho, A.P., Lisboa, C.V., Cupolillo, E., Mangia, R.H. *et al.* (1999) The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: A still unsolved puzzle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**, 203–204.
- Jansen, A.M., Xavier, S.C.C. & Roque, A.L.R. (2015) The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica*, **151**, 1–15.

- Jansen, A.M., Xavier, S.C. & Roque, A.L.R. (2018) *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, **11**, 502. <https://doi.org/10.1186/s13071018-3067-2>.
- Jansen, A.M., Xavier, S.C.d.C. & Roque, A.L.R. (2020) Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00010>
- Khan, F. & Corradini, L. (1994) Palmeiras da Amazônia. Centro Brasileiro de documentação.
- Lazzari, C.R., Pereira, M.H. & Lorenzo, M.G. (2013) Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 34–47.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979) Revision of the *Triatominae* (Hemiptera, *Reduviidae*), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **163**, 123–520.
- Lenzi, H.L., Jansen, A.M. & Deane, M.P. (1984) The recent discovery of what might be a primordial escape mechanism for *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **79**, 13–18.
- Magalhaes, L.K. (2015). Inquérito Soroepidemiológico para doença de chagas: percepção de uma população de área rural do Amazonas, sobre sua vulnerabilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Dissertação de mestrado). Laise Kelman Costa Magalhães. Orientadora Maria das Graças Vale Barbosa Guerra. Programa de pós graduação em Medicina Tropical., Manaus.
- Magalhães, B.M.L., Coelho, L.I.A.R.C., Maciel, M.G. *et al.* (2011) Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus, Coari, and Tefé in the Western Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44**, 697–702.
- Miles, M.A., Arias, J.R. & de Souza, A.A. (1983) Chagas' disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes*—triatomine vectors of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **78**, 391–398.
- Miranda, I., Rabelo, A., Bueno, C., Barbosa, E. & Ribeiro, M. (2001). *Frutos de Palmeiras da Amazônia*. INPA, Manaus.
- Monteiro, W.M., Barbosa, M.D.G.V., Toledo, M.J.D.O., Fé, F.A. & Fé, N.F. (2010) Series of acute Chagas' disease cases attended at a tertiary-level clinic in Manaus, State of Amazonas, from 1980 to 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **43**, 207–210.
- Monteiro, W.M., Magalhães, L.K.C., de Sá, A.R.N. *et al.* (2012) *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*, **7**, e41284.
- Noireau, F., Abad-Franch, F., Valente, S.A.S., Dias-Lima, A., Lopes, C.M. *et al.* (2002) Trapping *triatominae* in silvatic habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 61–63.
- O'Connor, O., Bosseno, M.F., Barnabé, C., Douzery, E.J.P. & Brenière, S.F. (2007) Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**, 587–593.
- Ortiz, J.V., Pereira, B.V.M., Couceiro, K.D.N., Silva, M.R.H.E., Doria, S.S. *et al.* (2019) Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **112**, 240–246.
- Pinto Dias, J., Novaes Ramos, A., Dias Gontijo, E., Luquetti, A., Aparecida Shikanai-Yasuda, M. *et al.* (2015) II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, **25**, 7–86.
- Rabinovich, J.E., dan Kitron, U., Obed, Y., Yoshioka, M., Gottdenker, N. & Chaves, L.F. (2011) Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: *Reduviidae*: *Triatominae*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**, 479–494.
- Ribeiro, G. Jr., Gurgel-Gonçalves, R., Reis, R.B., Santos, C.G.S., Amorim, A. *et al.* (2015) Frequent House Invasion of *Trypanosoma cruzi*-Infected Triatomines in a Suburban Area of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9**, e0003678.
- Ricardo-Silva, A.H., Lopes, C.M., Ramos, L.B. *et al.* (2012) Correlation between populations of *Rhodnius* and presence of palm trees as risk factors for the emergence of Chagas disease in Amazon region, Brazil. *Acta Tropica*, **123**, 217–223.
- Rivera, M.G., Herrera, L., Morocoima, A. *et al.* (2015) Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* TcI isolates from rural and urban areas of Venezuela. *Journal of Vector Borne Diseases*, **52**, 23–29.
- Rojas-Cortez, M., Arteaga, M., Uriona, L., Gamboa, S., Mejia, C. *et al.* (2016) *Trypanosoma cruzi*-infected *Panstrongylus geniculatus* and *Rhodnius robustus* adults invade households in the Tropics of Cochabamba region of Bolivia. *Parasites & Vectors*, **9**, 158.
- Roque, A.L.R., Xavier, S.C.C., Gerhardt, M. *et al.* (2013) *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Veterinary Parasitology*, **193**, 71–77.
- Santana, R.A.G., Magalhães, L.K.C., Magalhães, L.K.C., Prestes, S.R., Maciel, M.G. *et al.* (2014) *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasites & Vectors*, **7**, 267.
- Santana, R.A.G., Guerra, M.G.V.B., Sousa, D.R., Couceiro, K., Ortiz, J.V. *et al.* (2019) Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, **25**, 132–135.

- Santos Souza, E., Silva Monte, G.L., De Paiva, V.F. & Galvao, C. (2019) *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first record in the state of Amazonas, Brazil. *Check List*, **15**, 905–909.
- Shaw, J., Lainson, R. & Fralla, H. (1969) Considerações Sobre a epidemiologia dos Primeiros registrados Casos autóctones de Doença de Chagas em Belém, Pará, Brasil. *Rev. Saude Pública São Paulo*, **3**, 153–157.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.
- Teixeira, A.R.L., Monteiro, P.S., Rebelo, J.M. *et al.* (2001) Emerging chagas disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, **7**, 100–112.
- Valença-Barbosa, C., Fernandes, F.A., Santos, H.L.C., Sarquis, O., Harry, M. *et al.* (2015) Molecular identification of food sources in triatomines in the Brazilian northeast: Roles of goats and rodents in chagas disease epidemiology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**, 994–997.
- Valente, V.C., Valente, S.a., Noireau, F., Carrasco, H.J. & Miles, M.A. (1998) Chagas disease in the Amazon Basin: Association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 99–103.
- Valente, S.A.D.S., da Costa Valente, V., das Neves Pinto, A.Y., de Jesus Barbosa César, M., dos Santos, M. *et al.* (2009) 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.
- World Health Organization. (2019) Chagas Disease: Fact Sheet. Geneva Technical Report Series. [https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) [accessed on 11 March 2020].
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.a., Chiari, E. *et al.* (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**, 1051–1054.

4. CONCLUSÃO

1. Foram encontradas 4 espécies de triatomíneos (*Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus* e *Eratyrus mucronatus*) e 4 gêneros e duas espécies de reservatórios silvestres (*Didelphis marsupialis*, *Marmosa* spp, *Philander opossum* e *Proechimys* spp) de *T. cruzi* em Coari e Manaus.
2. Em triatomíneos observou-se maior ocorrência das espécies de *Rhodnius pictipes* e *R. robustus* em ambientes urbanos e em reservatórios de *Didelphis marsupialis* em áreas periurbanas de Manaus.
3. Registrou-se a ocorrência de formas imaturas e adultas de Triatomíneos, em 5 das 10 espécies de palmeiras estudadas, com maior frequência das espécies de *R. robustus* e *R. pictipes* em *Mauritia flexuosa* em ambientes urbanos de Manaus. Encontrou-se ainda formas adultas de *Panstrongylus geniculatus* e *Eratyrus mucronatus* dentro do domicílio em área rural.
4. Detectou-se alta taxa de infecção natural por *T. cruzi* tanto em triatomíneos quanto em reservatórios silvestres sendo maior em *Rhodnius pictipes* e em *Didelphis marsupialis*.
5. Registrou-se a ocorrência de sete haplotipos da linhagem de *T. cruzi* TcI, tanto em vetores quanto em reservatórios.
6. Identificou-se que o sangue de aves foi a fonte alimentar mais frequente em Triatomíneos coletados em ambientes rurais e urbanos de Manaus e Coari no Amazonas.

5. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVA

A limitação maior deste estudo foi observada nas coletas desenvolvidas fora do município sede, com poucos recursos para execução de coletas de material em maior tempo.

A perspectiva, continuar estudos sobre os vetores e hospedeiros silvestres em maior escala, para melhor compreensão da dinâmica de transmissão da doença de Chagas aos humanos nessa região.

6. REFERÊNCIAS DA TESE

1. Coura JR, Verissimo Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O. Chagas Disease: From Bush to Huts and Houses. Is it the Case of the Brazilian Amazon?. *Memorias do Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1999;94(1):379–84.
2. Coura JR, Junqueira ACV, Boia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, et al. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2002;44(3):159–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163910>
3. Coura JR. Tripanosomose, doença de chagas. *Ciênc cult (São Paulo)*. 2003;55(1):30–3.
4. Forattini O. Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil. *Rev Saude Pública São Paulo*. 1980;14.
5. Penna G de O. Doenças infecciosas e parasitárias : aspectos clínicos, de vigilância epidemiológica e de controle - guia de bolso. *Asp Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas Control Guia Bols* [Internet]. 1998;(Ministério da Saúde :Brasilia. Fundação Nacional de Saúde):220.
6. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas. *MINISTÉRIO DA SAÚDE Secr Vigilância em Saúde*. 2021;1–38.
7. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* [Internet]. 2015;151:1–15.
8. Kostygov AY, Karnkowska A, Votýpka J, Tashyreva D, Maciszewski K, Yurchenko V, et al. Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. Vol. 11, *Open Biology*. 2021.
9. World Health Organization. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2020.
10. Guhl F. Enfermedad de Chagas : Realidad y perspectivas. *Biomédica Rev del Inst Nac Salud*. 2009;20(18):228–34.
11. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2034–9.
12. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol*. 1999;108(4):401–7.
13. Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Ferreira LF, Araújo A, Vicente ACP, et al. Chagas disease in ancient Hunter-Gatherer population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(6):1001–2.
14. Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J Protozool*. 1980;27(1):37–58.

15. Guimarães-Pinto K, Nascimento DO, Corrêa-Ferreira A, Morrot A, Freire-de-Lima CG, Lopes MF, et al. Trypanosoma cruzi infection induces cellular stress response and senescence-like phenotype in murine fibroblasts. *Front Immunol*. 2018;9(JUL):1–11.
16. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* [Internet]. 2010;375(9723):1388–402.
17. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. Trypanosoma cruzi: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):1–12.
18. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83(2):141–52.
19. Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Trypanosoma cruzi: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*. 2002;100(4):269–75.
20. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31(5–6):472–81.
21. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Vol. 1, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. p. 159–218.
22. Dias E. Trypanosoma cruzi ou Schizotrypanum cruzi? *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1934;29(1):203–27.
23. Brener Z, Zilton Andrade. Trypanosoma Cruzi e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976.
24. Tanowitz HB, Kirchhoff L V, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Witfner M. Chagas ' Disease. 1992;5(4):400–19.
25. Chao C, Leone JL, Vigliano CA. Chagas disease: Historic perspective. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2020;1866(5).
26. Higo H, Miura S, Horio M, Mimori T, Hamano S, Agatsuma T, et al. Genotypic variation among lineages of Trypanosoma cruzi and its geographic aspects. *Parasitol Int*. 2004;53(4):337–44.
27. de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of Trypanosoma cruzi. *PLoS Pathog* [Internet]. 2006;2(3):e24.
28. Simpson L. The Kinetoplast of hemoflagellates. *Int. Rev. Cytol*. v.32, p.139- 207, 1972. *Int Rev Cytol*. 1972;32:139–207.
29. K S. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol Biochem Parasitol*. 1983;9:93–104.

30. Sanchez DO, Frasc ACC, Carrasco AE, Gonzalez-Cappa SM, de Isola ED, Stoppani AOM. Rapid evolution of kinetoplast DNA mini-circle subpopulations in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1984;11(C):169–78.
31. Das JK, Salam RA, Arshad A, Maredia H, Bhutta ZA. Community based interventions for the prevention and control of Non-Helminthic NTD (Provisional abstract). *Database Abstr Rev Eff [Internet]*. 2014;(2):24.
32. Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop*. 1974;65–121.
33. Toyé PJ. No Title Isoenzymic differences between culture forms of *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, and *T. lewisi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1974;68(4):266.
34. Miles MA, Miles MA, Povia MM, De Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, et al. Chagas's disease in the amazon basin: li. the distribution of *trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in para state, north brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(5):667–74.
35. Grisard EC, Carvalho-Pinto CJ, Scholz AF, Toma HK, Schlemper BR, Steindel M. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(February):795–800.
36. Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977;71(3):217–25.
37. Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: A multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*. 2000;120(5):513–26.
38. Romanha AJ, da Silva Pereira AA, Chiari E, Kilgour V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: Changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem*. 1979;62(2):139–42.
39. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(11 I):6810–4.
40. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1335–9.
41. ISRJ. Recommendations from a satellite meeting. Internartional Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of chagas disease, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:429–32.

42. Miles M a. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978;272(27):819–21.
43. Clark C, Pung O. Host specificity or ribosomal DNA variation in sylvatic *trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;6(6):175-179.
44. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*. 2000;30(1):35–44.
45. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell D a., Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051–4.
46. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009;136(6):641–55.
47. Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014;61(7):477–9.
48. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol [Internet]*. 2012;12(2):240–53.
49. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]*. 2015;13(8):995–1029.
50. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):1–19.
51. Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC V, Silva FM da, Pinto AY das N, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol*. 2009;39(5):615–23.
52. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future. *Parasitology*. 2009;136(12):1509–28.
53. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V., Oliveira M, et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25.

54. Barbosa M das GV, Ferreira JMB, Lima ARA, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Review Article Chagas disease in the State of Amazonas : history , epidemiological evolution , risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):27–33.
55. Miles M a., Arias JR, de Souza a. a. Chagas' disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes*--triatomine vectors of Chagas' disease. Vol. 78, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1983. p. 391–8.
56. Pinto AYDN, Ferreira AG, Valente VDC, Harada GS, Valente SADS. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica [Internet].* 2009;25(1):77–83.
57. Rivera MG, Herrera L, Morocoima A, Aguilar CM, G??rate T, L??pez M, et al. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* TcI isolates from rural and urban areas of Venezuela. *J Vector Borne Dis.* 2015;52(1):23–9.
58. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJDO, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One [Internet].* 2012;7(7):e41284. r
59. Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Gustavo Adolfo V, Montilla MM, et al. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res [Internet].* 2009;2009:1–9.
60. Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007;7(4):535–9.
61. Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal M V., et al. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol [Internet].* 2010;40(14):1599–607.
62. Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):1–7.
63. Carrasco HJ, Segovia M, Londoño JC, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez CE. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasit Vectors [Internet].* 2014;7(1):1003–28.
64. Añez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, et al. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Heal.* 2004;9(12):1319–1326.
65. Roellig DM, Brown EL, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ.

- Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1123–5.
66. Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2000;95(4):557–65.
 67. Lima S, Cristina S, Fabi I. Expanding the Knowledge of the Geographic Distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV / TcVI Genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014;1–16.
 68. Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago LS, Vera M, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: Parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–12.
 69. Khan F, Corradini L. *Palmeiras da Amazônia*. Centro Brasileiro de documentação; 1994.
 70. Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites and Vectors*. 2018.
 71. Lisboa C V., Mangia RH, Luz SLB, Kluczkovski A, Ferreira LF, Ribeiro CT, et al. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*. 2006;133(5):603–11.
 72. Nielebock MAP, Moreira OC, das Chagas Xavier SC, de Freitas Campos Miranda L, de Lima ACB, de Jesus Sales Pereira TO, et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. *PLoS One*. 2020;15(12 December):1–15.
 73. Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*. 2006;7:1–18.
 74. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles M a. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2011 Oct;5(10):e1363. 4&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
 75. Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* [Internet]. 2010;115(1–2):35–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.08.018>
 76. Barros JHS, Xavier SCC, Bilac D, Lima VS, Dario MA, Jansen AM. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Trop* [Internet]. 2017;172(May):173–9.
 77. Rodrigues MS, Morelli KA, Jansen AM. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and

- closely related species. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–18.
78. Acosta N, López E, Lewis MD, Llewellyn MS, Gómez A, Román F, et al. Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. *Parasitology*. 2017;144(7):884–98.
 79. Morocoima A, Carrasco H, Boadas J, Chique J, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi* III from armadillos (*Dasypus novemcinctus novemcinctus*) from Northeastern Venezuela and its biological behavior in murine model. Risk of emergency of Chagas' disease. *Exp Parasito*. 2012;132.
 80. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GAJ, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol*. 2005;35(2):225–33.
 81. Lisboa CV, Xavier SC das C, Herrera HM, Jansen AM. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol*. 2009;165(1–2):19–24.
 82. Rocha FL, Roque ALR, de Lima JS, Cheida CC, Lemos FG, de Azevedo FC, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain. *PLoS One*. 2013;8(7).
 83. Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira ACV, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol*. 2009;9(6):1265–74.
 84. Monje-Rumi MM, Brandán CP, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, et al. *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: Mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infect Genet Evol*. 2015;29(November):53–9.
 85. Ortiz S, Osorio G, Solari A. Minicircle classes heterogeneity within the TcIII and TcIV discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2017;51:104–7.
 86. Almeida L, Vasconcelos S De, Oliveira JC, Allan G, Augusto J, Guerra DO, et al. Case Report *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit TcIV implicated in a case of acute Chagas disease in a domiciliated dog in the western Amazon. 2021;1–4.
 87. Monteiro WM, Magalhães LKC, Oliveira JC, Guerra JA de O, Silveira H, Ferreira LC de L, et al. Comportamento biológico de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos no Estado do Amazonas, Amazônia Ocidental Brasileira, em camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2012 Apr;45(2):209–14.
 88. Perez-Molina JA, Poveda C, Martinez-Perez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M, et al. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;21:440–2.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.018>

89. Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2003;33(3):269–79.
90. Ihle-Soto C, Costoya E, Correa JP, Bacigalupo A, Cornejo-Villar B, Estadella V, et al. Spatio-temporal characterization of *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units infecting hosts and vectors from non-domestic foci of Chile. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(2):1–19.
91. Fernández M del P, Cecere MC, Lanati LA, Lauricella MA, Schijman AG, Gürtler RE, et al. Geographic variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units from *Triatoma infestans* at different spatial scales. *Acta Trop* [Internet]. 2014;140:10–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.014>
92. De Oliveira MT, Machado De Assis GF, Oliveira E Silva JCV, Machado EMM, Da Silva GN, Veloso VM, et al. *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (TcII and TcVI) in samples of patients from two municipalities of the Jequitinhonha Valley, MG, Brazil, using two molecular typing strategies. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–11.
93. Arenas M, Campos R, Coronado X, Ortiz S, Solari A. *Trypanosoma cruzi* genotypes of Insect Vectors and patients with Chagas of Chile studied by means of Cytochrome b gene sequencing, minicircle hybridization, and nuclear gene polymorphisms. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(3):196–205.
94. Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Brandán CM, Nuñez S, et al. Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2020;84(April):104329.
95. Acosta N, López E. Cepas de *Trypanosoma cruzi* en el Paraguay. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud*. 2013;11(2):78–89.
96. Oliveira MT de, Sulleiro E, Silva MC da, Silgado A, de Lana M, da Silva JS, et al. Intra-Discrete Typing Unit TcV Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagas' Disease Bolivian Immigrant Patients in Barcelona, Spain. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8(May):1–9.
97. Marcili A, Da Costa AP, Soares HS, Acosta IDCL, De Lima JTR, Minervino AHH, et al. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. *J Parasitol*. 2013;99(6):1071–6.
98. Lima L, Espinosa-??lvarez O, Ortiz PA, Trejo-Var??n JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting TcBat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* [Internet]. 2015;151(1):166–77.
99. Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*. 2009;110(2–3):88–100.

100. Carcavallo R, Giron I, Jurberg J, Lent J. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas. 1999.
101. Galvão C. Taxonomia dos vetores da doença de chagas da forma à molécula, quase três séculos de história. In: Oliveira. In: Oliveira, J., Chaboli K, Aranha L, Meneguetti D, editors. Atualidades em Medicina Tropical no Brasil Vetores: [Internet]. I. Rio Branco: Strict senso; 2020. p. 9–37.
102. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Am museum Nat Hist. 1979;163:123–520.
103. Dale C, Justi SA, Galvão C. *Belminus santosmalletae* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae): New species from Panama, with an updated key for *belminus* stål, 1859 species. Insects. 2021;12(8).
104. Zhao Y, Galvão C, Cai W. *Rhodnius micki*, a new species of triatominae (Hemiptera, reduviidae) from bolivia. Zookeys. 2021;2021(1012):71–93.
105. Galvão C, Paula AS de. Sistemática e evolução dos vetores [Internet]. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. 26–32 p. Available from: <http://books.scielo.org>
106. Galvão C, Justi SA. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). Acta Trop. 2015;151(1):116–25.
107. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):592–630.
108. Aragão MB. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? Rev Saude Publica. 1983;17(1):51–5.
109. Roque ALR, Maria Jansen A. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. p. 75–87.
110. Rabinovich JE, dan Kitron U, Obed Y, Yoshioka M, Gottdenker N, Chaves LF. Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(4):479–94.
111. Patrícia S, Freitas C, Seixas Lorosa E, Cristine D, Rodrigues S, Lindoval A, et al. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceará, Brasil Feeding patterns of *Triatoma pseudomaculata* in the state of Ceará, Brazil. 27 Rev Saúde Pública [Internet]. 2005;39(1):27–32.
112. Villela MM, Rodrigues VLCC, Casanova C, Dias JCP. Análise da fonte alimentar de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) e sua atual importância como vetor do *Trypanosoma cruzi*, no Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):125–8.
113. Bezerra CM, Barbosa SE, Souza RDCM De, Barezani CP, Gürtler RE, Ramos AN, et al. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: Food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. Parasites and Vectors.

- 2018;11(1):1–14.
114. Lehane MJ, Msangi AR, Whitaker CJ, Lehane SM. Grouping of trypanosome species in mixed infections in *Glossina pallidipes*. *Parasitology*. 2000;120(6):583–92.
 115. Couvreur TLP, Forest F, Baker WJ. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: Inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biol*. 2011;9.
 116. Govaerts R, Dransfield J. Lista de verificação mundial das Palmeiras. Royal Botanic Gardens; 2005.
 117. Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, et al. Emerging chagas disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(1):100–12.
 118. Gurgel-Gonçalves R, Cura C, Schijman AG, Cuba CAC. Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. *Acta Trop*. 2012;121(2):105–11.
 119. Abad-Franch F, Lima MM, Sarquis O, Gurgel-Gonçalves R, Sánchez-Martín M, Calzada J, et al. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. *Acta Trop* [Internet]. 2015;151:126–41.
 120. Julião GR, Pimentel IF, de França AK, Gil LHS, Simplício MF, Santos da Silva G dos, et al. *Rhodnius* spp. infestation in palm trees and natural infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in periurban and rural areas of state of the Rondônia, in the Brazilian Amazon. *Acta Trop*. 2021;220(May).
 121. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MDGV. Occurrences of triatomines in wild and domestic environments in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):642–6.
 122. Ricardo-Silva AH, Lopes CM, Ramos LB, Marques WA, Mello CB, Duarte R, et al. Correlation between populations of *Rhodnius* and presence of palm trees as risk factors for the emergence of Chagas disease in Amazon region, Brazil. *Acta Trop* [Internet]. 2012;123(3):217–23.
 123. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MDGV. Ocorrência de triatômíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):642–6.
 124. Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ, Aguilar HM, et al. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: Infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3).
 125. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.

- 2007;102 Suppl(2002):47–56.
126. Lazzari CR icard., Pereira MH oráci., Lorenzo MG ustav. Behavioural biology of Chagas disease vectors. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2013.
 127. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. Clin Infect Dis. 2012;54(6):845–52.
 128. dos Santos VRC, de Meis J, Savino W, Andrade JAA, Vieira JR dos S, Coura JR, et al. Acute chagas disease in the state of Pará, amazon region: Is it increasing? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(5):2–7.
 129. Nobre CA, Sampaio G, Borma LS, Castilla-Rubio JC, Silva JS, Cardoso M. Land-use and climate change risks in the amazon and the need of a novel sustainable development paradigm. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(39):10759–68.
 130. Mitja D, Delaître E, Santos AM, Miranda I, Coelho RFR, Macedo DJ, et al. Satellite Images Combined with Field Data Reveal Negative Changes in the Distribution of Babassu Palms after Clearing off Amazonian Forests. Environ Manage [Internet]. 2018;61(2):321–36.
 131. Santos WS, Gurgel-Gonçalves R, Garcez LM, Abad-Franch F. Deforestation effects on Attalea palms and their resident Rhodnius, vectors of Chagas disease, in Eastern Amazonia. PLoS One. 2021;16(5 May):1–22.
 132. Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. Belgian J Zool. 1997;127 Suppl:85–90.
 133. Futuyma DJ, Moreno G. The evolution of ecological specialization. Annu Rev Ecol Syst Vol 19. 1988;(20):207–33.
 134. Poulin R, Mouillot D. Parasite specialization from a phylogenetic perspective: A new index of host specificity. Parasitology. 2003;126(5):473–80.
 135. Poulin R, Krasnov BR, Mouillot D. Host specificity in phylogenetic and geographic space. Trends Parasitol [Internet]. 2011;27(8):355–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.05.003>
 136. Krasnov BR, Mouillot D, Shenbrot GI, Khokhlova IS, Poulin R. Beta-specificity: The turnover of host species in space and another way to measure host specificity. Int J Parasitol [Internet]. 2011;41(1):33–41.
 137. Jansen AM, Xavier SC das C, Roque ALR. Landmarks of the Knowledge and Trypanosoma cruzi Biology in the Wild Environment. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020.
 138. World Health Organization. No Title [Internet]. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2020. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
 139. Nowak RM. Walker's Mammals of the World,. 6th ed. Blatimore and Londres; 1999. 793 p.

140. Voss RS, Lunde DP, Jansa SA. On the contents of *Gracilinanus gardner* and *creighton*, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *Am Museum Novit.* 2005;(3482):1–34.
141. Olifiers N, Gentile R, Fiszon JT. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. *Braz J Biol.* 2005;65(3):495–501.
142. Fernandes O, Mangia RH, Lisboa C V., Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology.* 1999;118(2):161–6.
143. Legey AP, Pinho APS, Chagas Xavier SC, Leon LL, Jansen AM. Humoral Immune Response Kinetics in *Philander opossum* and *Didelphis marsupialis* Infected and Immunized by *Trypanosoma cruzi* Employing an Immunofluorescence Antibody Test. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(3):371–6.
144. Kay EH, Hoekstra HE. Rodents. *Curr Biol.* 2008;18(10):406–10.
145. Roque ALR, Xavier SCC, Da Rocha MG, Duarte ACM, D’Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(5):742–9.
146. Yefi-Quinteros E, Muñoz-San Martín C, Bacigalupo A, Correa JP, Cattan PE. *Trypanosoma cruzi* load in synanthropic rodents from rural areas in Chile. *Parasites and Vectors.* 2018;11(1):1–7.
147. Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J Parasitol.* 2006;92(6):1251–5.
148. Ramsey JM, Gutiérrez-Cabrera AE, Salgado-Ramírez L, Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Ibarra-Cerdeña CN. Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease. *PLoS One.* 2012;7(9).
149. Nowak RM. *Walker’s Mammals of The World.* 6th ed. Baltimore, Londres: American Society of Mammalogists; 2005. 328 p.
150. Barreto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979.
151. Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol [Internet].* 2011;27(10):459–66.
152. Roque AL, Jansen AM. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(Suplemento III):191–3.
153. Pineda V, Saldaña A, Monfante I, Santamaría A, Gottdenker NL, Yabsley




- MJ, et al. Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet Parasitol.* 2011;178(3–4):360–3.
154. Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Petersen RM, Chuit R, Segura EL, et al. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(1):95–103.
 155. Gürtler RE, Lauricella M, Solarz ND, Bujas MA, Wisnivesky-Colli C. Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. I--The dog reservoir: an epidemiological profile. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986;28(1):28–35.
 156. Montenegro VM, Jiménez M, Pinto Dias JC, Zeledón R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(4):491–4.
 157. Cruz ACFG, Santos NAF, Jeraldo V de LS, Madi RR, Rosa JA da, Melo CM de. Shelter dogs as indicators for *Trypanosoma cruzi* infection in an urban area of Aracaju, Brazil. *Acta Trop [Internet].* 2020; 210(February): 105577.
 158. Donadio E, Buskirk SW. Diet, morphology, and interspecific killing in carnivora. *Am Nat.* 2006;167(4):524–36.
 159. Raccurt C. *Trypanosoma cruzi* en Guyane Française: revue des données accumulées depuis 1940 [*Trypanosoma cruzi* in French Guinea: review of accumulated data since 1940]. *Med Trop.* 1996;56(1):79–87.
 160. Fenton MB, Simmons N, Fenton MB, Simmons N. Bats: A World of Science and Mystery. In: *It's a Bat!* Chicago: University of Chicago Press; 2014. p. 240.
 161. Paglia AP, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, et al. *Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil.* 2012.
 162. Thoisy B De, Bourhy H, Delaval M, Pontier D. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. 2016;1–21.
 163. Jr GS, Gonçalves F, Maia M, Vieira TM, Muylaert RDL, Lima SM, et al. Evidence of Hantavirus Infection among Bats in Brazil. 2015;93(2):404–6.
 164. Olival KJ, Islam A, Yu M, Anthony SJ, Epstein JH, Khan SA, et al. Antibodies in Fruit. 2013;19(2):270–3.
 165. Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the ' bat seeding ' hypothesis. *Trends Parasitol [Internet].* 2012;28(4):136–41.
 166. Thomas ME, Iv JJR, Alessandro AD. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. Vol. 102. 2007. 559–565 p.
 167. Gardner A. Feeding habits. In: Baker J, Jones J, Varter D, editors. *Biology*

- of bats of the New World family Phyllostomidae Part II. Texas: Texas Tech Press; 1977. p. 293–350.
168. Barret T, Arias JR. A new triatomine host of *Trypanosoma* from Central Amazon of Brazil: *Cavernicola lenti*. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985;80(1):91–6.
 169. Arias-Giraldo LM, Muñoz M, Hernández C, Herrera G, Velásquez-Ortiz N, Cantillo-Barraza O, et al. Identification of blood-feeding sources in *Panstrongylus*, *Psammolestes*, *Rhodnius* and *Triatoma* using amplicon-based next-generation sequencing. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2020;13(1):1–14.
 170. Miles MA, de Souza AA, Póvoa M. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. *J Med Entomol*. 1981;18(4):266–78.
 171. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tc_{bat} as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* [Internet]. 2015;151(1):166–77.
 172. Lisboa CV, Monteiro RV, Martins AF, Das Chagas Xavier SC, Dos Santos Lima V, Jansen AM. Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in free-ranging population of lion tamarins (*Leontopithecus* spp): An 11-year follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):394–402.
 173. Bommineni YR, Dick EJ, Estep JS, Van de Berg JL, Hubbard GB. Fatal acute Chagas disease in a chimpanzee. *J Med Primatol*. 2009;38(4):247–51.
 174. Dorn PL, Daigle ME, Combe CL, Tate AH, Stevens L, Phillippi-Falkenstein KM. Low prevalence of chagas parasite infection in a nonhuman primate colony in Louisiana. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(4):443–7.
 175. Minuzzi-Souza TTC, Nitz N, Knox MB, Reis F, Hagström L, Cuba Cuba CA, et al. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):7–12.
 176. Bonecini-Almeida M, Galvão-Castro B, Pessoa HR, Pirmez C, Laranja F. Bonecini_Almeida 1990.pdf. Vol. 85, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990. p. 163–71.
 177. Espinola Carvalho CM, Ribeiro Andrade MC, Salles Xavier S, Riccioppo Mangia RH, Carvalho Britto C, Jansen AM, et al. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(6):683–91.
 178. Monteiro RV, Baldez J, Dietz J, Baker A, Lisboa CV, Jansen AM. Clinical, biochemical, and electrocardiographic aspects of *Trypanosoma cruzi*

- infection in free-ranging golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *J Med Primatol.* 2006;35(1):48–55.
179. Cicmanec J, Neva F, McClure H, Loeb W. Accidental infection of laboratory-reared *Macaca mulatta* with *Trypanosoma cruzi*. *Lab Anim Sci.* 1974;24:783–787.
 180. Kasa T, Lathrop G, Dupuy H, Bonney C, Toft J. An endemic focus of *Trypanosoma cruzi* infection in a subhuman primate research colony. *J Am Vet Med Assoc.* 1977;171::850–854.
 181. Belchimol AB. Doença de Chagas nos grandes centros urbanos. Vol. 1, *Anais do Congresso Internacional sôbre a Doença de Chagas.*, Rio de Janeiro; 1961.
 182. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1–2):22–7.
 183. Novaes A, Jr R, Carvalho DM De. [Editorial - Chagas ' Disease : past , present and future]. 2014;(June 2009).
 184. World Health Organization. Chagas disease: Fact sheet [Internet]. Vol. 304, Geneve: Technical Report Series. 2019. p. 1–4.
 185. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2016;25:7–86.
 186. Bello Corassa R, Aceijas C, Alves PAB, Garelick H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review. *Perspect Public Health.* 2017;137(5):289–95.
 187. Santos EF, Silva ÂAO, Leony LM, Freitas NEM, Daltro RT, Regis-Silva CG, et al. Acute chagas disease in brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8):1–16.
 188. Pinto AYDN, Valente SA, Valente VDC, Ferreira AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(6):602–14.
 189. Souza-Lima R de C, Barbosa M das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento A da S, Ferreira JMBB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(4):510–4.
 190. Medeiros MB De, Guerra JA de O, Lacerda MVG de. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(5):520–1.
 191. Santana RA, Magalhães LK, Magalhães LK, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GA, et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014;7(1):267.

7. ANEXOS

7.1 Procedimentos operacionais padrão

		FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: EXTRAÇÃO DE DNA POR KIT, UTILIZANDO PURELINK KIT® (INVITROGEN)			
Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Rosa Amélia Gonçalves Henrique Silveira	Data de aplicação 25 de abril de 2019 Data da próxima revisão 25 de abril de 2020	

1. Objetivo

Descrever o procedimento para extração de DNA de *Trypanosoma cruzi*, a partir da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), do intestino ou fezes do vetor, da cultura e do material no papel de filtro.

Definições

Isolamento da molécula de DNA, a partir de material biológico.

Campo de aplicação

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

4. Responsabilidades

Gerente da unidade, responsável técnico, alunos de doutorado e de mestrado. Além disso, alunos de iniciação científica devem ser acompanhados.

5. Pop'S relacionados

POP_ENT_Procedimento da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* – Protocolo GPI (Gene da Glicose-6- fosfato isomerase).

POP_ENT_Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação do produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

POP_ENT_Protocolo da reação de sequenciamento para o analisador automático ABI 310 (sequenciador).

6. Equipamento de proteção necessário

Jaleco, luvas, máscara e touca.

7. Recursos necessários

7.1 Amostra

7.1.1. Camada leucoplaquetária (*buffy coat*), do intestino ou fezes do vetor, da cultura e do material no papel de filtro.

7.2 Materiais

7.2.1. Microtubo (Eppendorf) de 1,5 mL.

7.2.2. Ponteiras descartáveis, com filtro em suporte apropriado.

7.2.3. Pipetal de 2 µL, 10 µL, 100 µL e 1000 µL.

7.2.4. Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio.

7.2.5. Frasco lavador com álcool 70%.

7.3 Equipamentos

7.3.1. Centrífuga

7.3.2. Banho-maria e termômetro (56°C)

7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)

7.4 Reagentes, meios e soluções

7.4.1. PureLink Kit® (Invitrogen) – Genomic Digestion Buffer, Genomic Lysis/Binding Buffer, Wash Buffer 1 e 2, Genomic Elution Buffer, Proteinase K, RNase A.

7.4.2. PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7,2.

7.4.3. Etanol 96-100%.

8. Procedimentos

8.1. Informações importantes antes de iniciar os procedimentos

Vários procedimentos devem ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas à PCR:

*Limpar a bancada onde se irá trabalhar e as pipetas que serão utilizadas com hipoclorito de sódio e álcool 70%, antes e após o procedimento.

*Empregar materiais de consumo novos (não reciclados).

*Distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluindo o kit com a enzima.

*Utilizar apenas ponteiras protegidas por filtros.

*Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras, durante a homogeneização.

*Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.

Durante toda a execução da técnica, usar luvas, que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra.

8.2. Material: camada leucoplaquetária (*buffy coat*), cultura

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen): Blood Lysate.

8.2.1. Em um microtubo (Eppendorf), adicionar 200 µL do material (se < 200 µL, completar com PBS);

8.2.2. Adicionar 20 µL de Proteinase K;

8.2.3. Adicionar 20 µL de RNase A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;

8.2.4. Adicionar 200 µL do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar para obter uma solução homogênea;

8.2.5. Incubar a 55°C por 10 minutos;

8.2.6. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;

8.2.7. Utilizar a coluna e o tubo coletor;

8.2.8. Adicionar aproximadamente 640 µL do lisado (tomar cuidado com a esponja da coluna);

8.2.9. Centrifugar a coluna a uma velocidade de 10 000 x g (ou 10 350 rpm) por 1 minuto;

8.2.10. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor;

8.2.11. Adicionar 500 µL de Wash Buffer 1 (observar se está preparado);

8.2.12. Centrifugar a coluna a uma velocidade de 10 000 x g (ou 10 350 rpm) por 1 minuto;

8.2.13. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor;

8.2.14. Adicionar 500 µL de Wash Buffer 2 (observar se está preparado);

- 8.2.15. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 3 minutos;
- 8.2.16. Colocar a coluna em um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.2.17. Adicionar mais 25 µL - 200 µL do Genomic Elution Buffer na coluna;
- 8.2.18. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 2 minutos;
- 8.2.19. O microtubo (Eppendorf) contém o DNA purificado, remover e descartar a coluna;
- 8.2.20. Armazenar o DNA extraído em freezer a -20°C.

8.3. Material: Vektor e fezes com intestino do vektor

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen): Mammalian tissue and mouse/rat tail lysate.

- 8.3.1. Utilizar ¼ do vektor, remover e descartar as pernas;
- 8.3.2. Adicionar 90 µL do Genomic Digestion Buffer e macerar;
- 8.3.3. Adicionar mais 90 µL do Genomic Digestion Buffer ao macerado;
- 8.3.4. Adicionar 20 µL de Proteinase K;
- 8.3.5. Incubar a 55°C de 4 a 24 horas;
- 8.3.6. Centrifugar em velocidade máxima por 3 minutos em temperatura ambiente;
- 8.3.7. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.3.8. Adicionar 20µL de RNAse A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
- 8.3.9. Adicionar 200µL do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar para obter uma solução homogênea;
- 8.3.10. Adicionar 200µL de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;
- 8.3.11. Seguir os mesmos procedimentos desde o item 8.2.7.

8.4. Material: Papel de filtro com material

Obs: Retirado do Manual da PureLink Genomic DNA Kits® (Invitrogen): Blood spots.

- 8.4.1. Cortar 2-5 pedaços de papel filtro, cada 2-3mm e adicionar em um microtubo (Eppendorf);
- 8.4.2. Adicionar 90 µL do Genomic Digestion Buffer e macerar;
- 8.4.3. Adicionar mais 90 µL do Genomic Digestion Buffer ao macerado;
- 8.4.4. Adicionar 20 µL de Proteinase K;
- 8.4.5. Incubar a 55°C por 30 minutos;
- 8.4.6. Centrifugar em velocidade máxima por 2-3 minutos,
- 8.4.7. Transferir todo o líquido para um novo microtubo (Eppendorf);
- 8.4.8. Adicionar 20µL de RNAse A, vortexar e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
- 8.4.9. Adicionar 200µL do Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexar para obter uma solução homogênea;
- 8.3.10. Adicionar 200µL de etanol (96-100%), vortexar por 5 segundos;
- 8.3.11. Seguir os mesmos procedimentos desde o item 8.2.7.

9. Padrão e material de referência

1. Livro de protocolo do fabricante do Purelink Genomic DNA Kits, invitrogen.

10. Limitações

- 10.1. O material de sangue ou cultura, para ser extraído, é necessário, segundo o fabricante, ter no mínimo 200µL de material;
- 10.2. Protocolos de extração por kit, geralmente, perdem mais DNA no processo de purificação do que protocolos de extração, utilizando métodos caseiros.

11. Referências

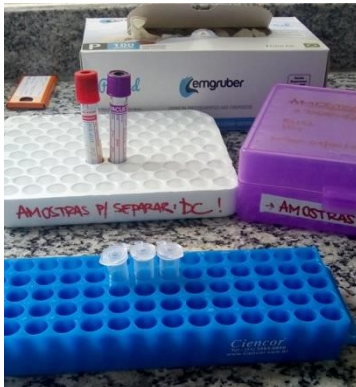
1. Schaerfer R. Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa. 2006.

12. ANEXOS

12.1 Separação do soro, plasma e camada leucocitária nas amostras (“buffy coat”).

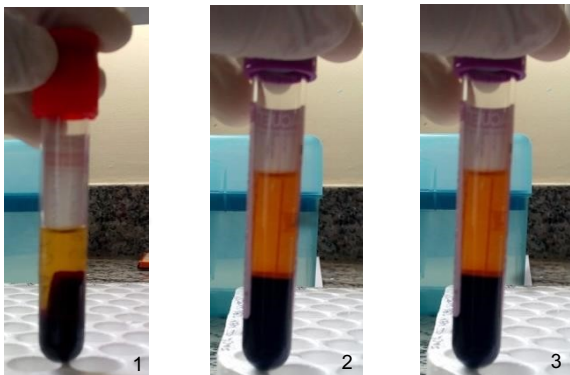
Anexo I

12.1 Separação do soro, plasma e camada leucocitária nas amostras (“buffy coat”).



Fonte: Ortiz, J. 2019.

Etapa 1: Separar três microtubos e identificar.


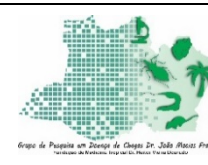


Fonte: Ortiz, J. 2019.

Etapa 2: Do tubo vermelho separar o soro (1), do tubo roxo separar o plasma (2) e o “buffy coat”

(3)

Obs: Este material deve ser armazenado em freezer -20°C

	<p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> - Protocolo Multiplex mini exon.</p>		
<p>Elaborado por: Henrique Silveira Laylah Magalhães</p> <p>Adaptado por: Débora Raysa T. de Sousa</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p>	<p>Data de aplicação 25 de abril de 2019</p> <p>Data da próxima revisão 25 de abril de 2020</p>

OBJETIVOS

Descrever o procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) e o protocolo mini exon para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e diferenciação de linhagens TcI, TcII, Z3 e *T. rangeli*

DEFINIÇÕES

Reação em cadeia da polimerase: Técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico, a partir de um molde de DNA, por meio de uma reação enzimática, na ausência de um organismo vivo. Iniciador ou primer: pequena sequência de DNA ou RNA, a partir da qual pode se iniciar a replicação do DNA.

APLICÁVEL

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e ao diagnóstico laboratorial de pesquisa.

RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

POPs RELACIONADOS

Procedimento para extração de DNA por kit, utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* - Protocolo COII (subunidade II da citocromo oxidase).

RECURSOS NECESSÁRIOS

DNA extraído: A partir da extração, por Kit ou caseira

Materiais:

6.2.1 Tubo tipo Eppendorf de 0,2 mL e 1,5 mL

- 6.2.2 Ponteiras descartáveis com filtro em suporte apropriado
- 6.2.3 Pipetas de 2, 10, 100 e 1.000 µL
- 6.2.4 Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio
- 6.2.5 Frasco lavador com álcool 70%
- 6.2.6 Elenmeyer 100ml
- 6.2.7 Proveta 100ml
- 6.3 Equipamentos:
 - 6.3.1 Termociclador
 - 6.3.2 Fonte de eletroforese
 - 6.3.3 Agitador de tubos
 - 6.3.4 Microondas
- 6.4 Reagentes, meios e soluções:
 - 6.4.1 Frasco com água ultrapura
 - 6.4.2 Buffer de PCR 10x
 - 6.4.3 MgCl₂ 50mM
 - 6.4.4 Nucleotídeos dATP + dCTP + dTTP + dGTP 10mM
 - 6.4.5 Primer: TcI
 - 6.4.6 Primer: TcII
 - 6.4.7 Primer: Z3
 - 6.4.8 Primer TR
 - 6.4.9 Exon
 - 6.4.10 Enzima Taq Polymerase Platinum 5U
 - 6.4.11 Marcador de peso molecular
Diluir o marcador (40µl de água destilada+ 10µl de tampão de corrida + 10µl de marcador de peso molecular)
 - 6.4.12 Solução tampão para eletroforese
Diluir o TBE 10X para 1X (100ml de TBE 10X para 900ml de água destilada)
 - 6.4.13 Tampão de corrida
 - 6.4.14 Brometo de etídio

PROCEDIMENTOS

7.1 Mix da PCR

As quantidades fornecidas a seguir correspondem a valores empregados para uma única amostra de DNA.

Obs: A cada reação incluir uma alíquota de amostra, comprovadamente positiva, além do controle negativo (apenas o mix).

7.1.1 Em um microtubo tipo eppendorf, acrescentar os seguintes produtos:

Reagentes	Quantidade (µl)
H ₂ O	31,00
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl ₂	3,00
dNTP	3,00
TcI	0,50
TcII	0,50
Z3	0,50
TR	0,50
Exon	0,50
Taq DNA Polimerase	0,50
Total	45,00

Obs: Adicionar os reagentes, na ordem do maior volume para o menor, deixando a Taq Polimerase por último. A mistura deve ser realizada o tempo todo no gelo.

7.1.2 Após homogeneização, transferir 45 µL da mistura anterior para um tubo Eppendorf de 0,2 µL

7.1.3 Adicionar 5µL do DNA extraído

7.2 Ciclos Térmicos

7.2.1 Introduzir os tubos no termociclador, programados para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	5 min	1X
94°C	30 seg	35X
55°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	10 min	1X
4°C	Infinito	

7.3 Controles

7.3.1 A cada reação, adicionar uma amostra, comprovadamente positiva e uma negativa (um eppendorf com apenas o mix)

7.4 Eletroforese

7.4.1 Para fazer um gel de 2%

7.4.1.1 Pesar 2g de agarose

7.4.1.2 Medir em uma proveta 100ml de TBE

7.4.1.3 Adicionar em um elenmeyer a agarose e o TBE

7.4.1.4 Levar ao micro-ondas até diluir (aparência límpida)

7.4.1.5 Montar uma placa molde com um pente para formar os poços no gel

7.4.1.6 Adicionar a mistura na placa e aguardar a polimerização

7.4.2 Colocar a placa com gel na cuba de eletroforese

7.4.3 Adicionar o tampão de eletroforese (TBE 1x).

7.4.4 Misturar 2 µL de tampão de corrida e 8 µL de DNA, amplificado em cada poço no gel

7.4.5 No primeiro poço do gel aplicar 5 µL da solução diluída do marcador de peso molecular

7.4.6 Promover uma corrida de aproximadamente 40 minutos a 100V (volts) e 90 de corrente.

7.4 Revelação

7.4.1 Fazer a leitura do gel no Transiluminador - UV

7.4.2 A visualização de uma única banda de pares de base, com peso molecular de 200pb, indicará a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* amplificado (PCR positiva).



LIMITAÇÕES E CUIDADOS A SEREM TOMADOS

Vários procedimentos devem ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR:

- Limpar a bancada onde irá trabalhar e as pipetas que irão utilizar com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes e depois do procedimento.
- Empregar materiais de consumo novos (não reciclados). - distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima.
- Utilizar apenas ponteiras protegidas por filtros.
- Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras durante a homogeneização.
- Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.
- Durante toda a execução da técnica, usar luvas que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra ou quando achar necessário.
- Realizar o manuseio do produto amplificado em sala separada, com equipamentos também individualizados inclusive o jaleco.
- Na etapa da pré-amplificação, todos os tubos com reagentes deverão ser deixados em banho de gelo até o momento de serem introduzidos no termociclador.

REFERÊNCIAS

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(1):97–9.

	<p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP</p>		
<p>TÍTULO: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> – PROTOCOLO DO GENE QUE CODIFICA A SUBUNIDADE II DA CITOCROMO OXIDASE (COII)</p>		
<p>Elaborado por: Débora Raysa T. de Sousa</p>	<p>Revisado e aprovado por:</p>	<p>Data de aplicação 25 de abril de 2019</p> <hr/> <p>Data da próxima revisão 25 de abril de 2020</p>

OBJETIVO

Descrever o procedimento da PCR – protocolo COII utilizado para o diagnóstico complementar da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e diferenciação de linhagens TcI, TcII e Zimodema 3 (Z3).

DEFINIÇÕES

Reação em cadeia da polimerase: técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde de DNA, por meio de uma reação enzimática, na ausência de um organismo vivo.

Iniciador ou primer: pequena sequência de DNA ou RNA a partir da qual pode se iniciar a replicação do DNA.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial complementar.

RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável técnico, alunos de doutorado, e de mestrado. Alunos de iniciação científica devem ser acompanhados.

POP’S RELACIONADOS

- POP armazenamento
- POP extração de DNA
- POP PCR GPI
- POP Sequenciamento

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

- Jaleco
- Luvas
- Máscara
- Touca

RECURSOS NECESSÁRIOS

Amostra

7.1.1. DNA extraído (conforme POP Extração de DNA)

Materiais

- 7.2.1. Microtubo (Eppendorf) de 0,2 mL e 1,5 mL.
- 7.2.2. Ponteiras descartáveis com filtro, em suporte apropriado.
- 7.2.3. Pipetal de 2 µL, 10 µL, 100 µL e 1000 µL.
- 7.2.4. Caixa de descarte de material com hipoclorito de sódio.
- 7.2.5. Frasco lavador com álcool 70%.
- 7.2.6. Erlenmeyer (100mL).
- 7.2.7. Proveta (100mL).

Equipamentos

- 7.3.1. Termociclador
- 7.3.2. Fonte de eletroforese
- 7.3.3. Agitador de tubos (Vortex)
- 7.3.4. Microondas

Reagentes, meios e soluções

- 7.4.1. Frasco com água ultrapura (H₂O UP).
- 7.4.2. Buffer de PCR 10x.
- 7.4.3. MgCl₂ 50mM.
- 7.4.4. Nucleotídeos dNTPs(dATP + dCTP + dTTP + dGTP 10mM).
- 7.4.5. Primer: TcMit 31 (5' – TAAATAATATATATTGTACATGAG- 3') 50mM.
- 7.4.6. Primer: TcMit 40 (5' – CTCATTGYCCATATATTGT- 3') 50mM.
- 7.4.7. Enzima Taq polimerase (Taq Polymerase Platinum) 5U.
- 7.4.8. Marcador de peso molecular (Diluir o marcador: 40 µL de água destilada + 10 µL de tampão de corrida + 10 µL do marcador de peso molecular).
- 7.4.9. Solução tampão para eletroforese (Diluir o TBE 10X para 1X: 100mL de TBE 10X + 900mL de água destilada).
- 7.4.10. Tampão de corrida.
- 7.4.11. Brometo de etídeo.

PROCEDIMENTOS

Mix da reação (PCR)

Obs. 1: As quantidades fornecidas a seguir correspondem a valores empregados para uma única amostra de DNA.

Obs. 2: A cada reação, incluir uma alíquota de amostra positiva, além do controle negativo (apenas o mix).

8.1.1. Em um microtubo (Eppendorf), acrescentar os seguintes produtos:

Reagentes	Quantidade (µL)
H₂O	36,30
Buffer de PCR 10x	5,00
MgCl₂	1,50
dNTP	1,00
TcMit 31	0,50
TcMilt 40	0,50

Taq DNA Polimerase	0,20
Total	45,00
DNA	5,00

Obs. 3: Adicionar os reagentes, na ordem do maior volume para o menor, deixando a Taq polimerase por último. A mistura deve ser realizada o tempo todo no gelo.

8.1.2. Após homogeneização, transferir 45 µL da mistura anterior para um microtubo (Eppendorf) de 0,2 µL.

8.1.3. Adicionar 5 µL do DNA extraído.

Ciclos térmicos

8.2.1. Introduzir os tubos do termociclador, o qual é programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	5 min	1X
95°C	30 seg	35X
48°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1X
4°C	Infinito	

Controles

8.3.1. A cada reação adicionar uma amostra positiva e uma negativa (um Eppendorf com apenas um mix)

8.4 Eletroforese em gel de agarose

8.4.1. Para fazer um Gel 2%: pesar 2g de agarose; medir em uma proveta 100mL de TBE; adicionar em um erlenmeyer a agarose + TBE; levar ao microondas até diluir (aparência límpida).

8.4.2. Montar uma placa molde com um pente, para formar os poços no gel;

8.4.3. Adicionar à mistura 5 µL de brometo de etídeo e, logo, colocar essa mistura na placa e aguardar a polimerização;

8.4.4. Colocar a placa com gel na cuba de eletroforese;

8.4.5. Adicionar o tampão de eletroforese (TBE 1X);

8.4.6. Misturar 2 µL de tampão de corrida e 5 µL de DNA amplificado em cada poço no gel;

8.4.7. No primeiro poço, aplicar 5 µL da solução diluída do marcador de peso molecular;

8.4.8. Promover uma corrida de, aproximadamente, 40 minutos a 100V (volts) e 90A (amperes) de corrente.

8.5 Revelação

8.5.1. Fazer a leitura do gel no Transiluminador-UV;

8.5.2. A visualização de uma única banda de peso molecular 420pb indicará a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* amplificado (PCR positiva)

LIMITAÇÕES

Vários procedimentos devem ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR:

- *Limpar a bancada onde irá trabalhar e as pipetas que irão utilizar com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes e depois do procedimento.
- *Empregar materiais de consumo novos (não reciclados).
- *Distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima.
- *Utilizar apenas ponteiras protegidas por filtros.
- *Empregar tubos tipo Eppendorf que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento de amostras durante a homogeneização.
- *Todo o material permanente deverá ser limpo com hipoclorito de sódio e submetido à luz UV.

Durante toda a execução da técnica, usar luvas que deverão ser descartadas a cada contaminação por amostra ou quando achar necessário.

*Realizar o manuseio do produto amplificado em sala separada, com equipamentos também individualizados inclusive o jaleco.

*Na etapa da pré-amplificação, todos os tubos com reagentes deverão ser deixados em banho de gelo até o momento de serem introduzidos no termociclador.

REFERÊNCIAS

1. Ávila HÁ, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48:211-22.

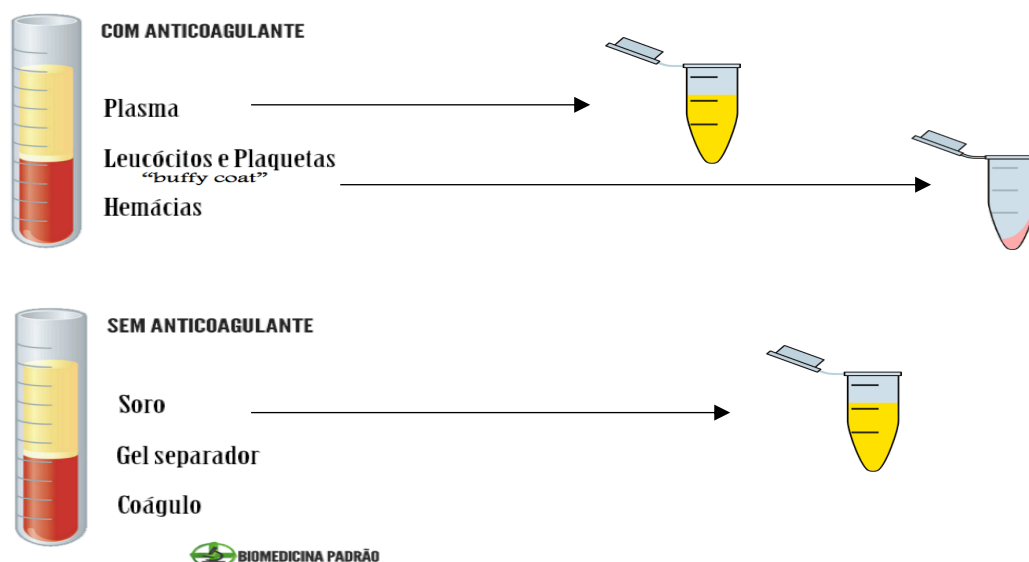
2. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998; 88: 28- 33.



3. Sturm NR, Degraive W, Morel CM, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33: 205-14

ANEXOS

ANEXO III

Identificação e separação do soro, do plasma e da camada leucocitária nas amostras.



	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: Xenodiagnóstico direto		
Elaborado por: Rubens Celso Andrade Junior, Emily Moura, Laylah Magalhaes	Revisado e aprovado por:	Data de aplicação Data da próxima revisão

OBJETIVO

Descrever os procedimentos necessários para xenodiagnóstico, direto em pacientes com doença de Chagas aguda ou crônica.

DEFINIÇÕES

Não se aplica

CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se a serviços de xenodiagnóstico por triatomíneos, realizados pelo centro de entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

RESPONSABILIDADES

Gerentes, técnicos e alunos PAIC e Pós-graduação.

POP'S RELACIONADOS

Criação de triatomíneos

5.2 Detecção de *Trypanosoma cruzi* por compressão abdominal.

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Touca

Máscara

Jaleco descartável

Luva descartável

7. RECURSOS NECESSÁRIOS

Equipamentos utilizados:

Poltrona

Materiais utilizados

20 ninfas de triatomíneos de cada espécie (40 no total)

Lápis

Borracha

Pinça de ponta fina

Dexametasona

Álcool 70%

Gaze

Atadura

Tesoura

Esparadrapo

Filó

Papel filtro

Liga elástica
Ficha para histórico do paciente
Álcool iodado

PROCEDIMENTOS

Separação dos insetos

Separar os insetos em potes limpos e que estejam em jejum no mínimo 30 dias.

Seguir o protocolo de criação de triatomíneos item 8.1.3

Após a finalização da separação dos insetos, identificar o pote com o nome do paciente e a data;

Reservar numa bandeja a dexametasona, gaze, esparadrapo, atadura, tesoura e álcool 70% e álcool iodado;

Realização do exame

Cortar a atadura no tamanho apropriado que envolva o braço do paciente, sendo utilizados os dois braços para o exame;

Com o paciente sentado sobre a poltrona e braços esticados, sobrepor o pote de triatomíneos na região frontal do antebraço, sentido que o filo esteja em contato com a pele;

Após a sobreposição do pote, contornar a atadura em toda a região do antebraço do paciente.

Resguardar o tempo de 1h, para finalização deste exame;

Após a finalização do exame, retirar o pote com triatomíneos e reserva-los para posterior acondicionamento na sala de criação de triatomíneos.

Fazer a assepsia com álcool 70% e álcool iodado e friccionar dexametasona no local da realização do exame.

Preenchimento do histórico do Paciente

No intervalo de espera do exame, iniciar o preenchimento do histórico do paciente, descrevendo todas as informações necessárias;

Após o preenchimento, guardar no ficheiro da pasta de xenodiagnóstico, mantidas na sala de criação de triatomíneos.

Após a finalização dos métodos, preencher a requisição para entrega do exame ao paciente, respeitando a forma da doença de Chagas: agudo (30 dias) e crônico (90 dias).

Infecção natural

O exame para formas flagelares, a partir dos Triatomíneos oriundos de pacientes com chagas aguda, poderá ser iniciado a partir do 7º dia e 90 dias, para os casos na forma crônica.



Selecionar duas espécies, por pote, para fazer a compressão abdominal e leitura de todo conteúdo estomacal

Seguir protocolo de detecção de *Trypanosoma cruzi* por compressão abdominal.

LIMITAÇÕES

Taxa de mortalidade de vetores alta

Sensibilidade do exame é baixa

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: Detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos por compressão abdominal		
Elaborado por: Rubens da Silva Junior Laylah Magalhães Sílvia Justiniano	Revisado e aprovado por:	Data de aplicação Data da próxima revisão

OBJETIVO

Descrever o procedimento para detecção de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos.

DEFINIÇÕES

Não se aplica

APLICÁVEL A:

Pesquisa parasitária em triatomíneos que possam estar infectados por *T. cruzi*

RESPONSABILIDADES

Gerência da Entomologia, técnicos e alunos de mestrado e doutorado.

POP'S RELACIONADOS

Cultivo de *T. cruzi* em meio sólido (meio NNN)

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO

Óculos de proteção
 Jaleco
 Luvas
 Máscara

RECURSOS NECESSÁRIOS

Placa de petri
 Pinças
 Lâminas
 Lamínulas
 Soro fisiológico
 Seringa de 1ml
 Papel toalha
 Microtubos 1,5 ml
 Tesoura

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

Lupa estereoscópica
 Microscópio

PROCEDIMENTOS

Acondicionar o triatomíneo em placa de petri e levar a lupa;
 Com auxílio de pinças, imobilizar o triatomíneo, pelo tórax, sobre a lâmina;
 Com outra pinça fazer leves compressões no abdômen do inseto, de cima para baixo, até que as excretas saiam;
 Cortar o último segmento do abdômen e, com auxílio de pinça, retirar o intestino médio de forma lenta.
 Macerar o intestino médio na lâmina.

Em triatomíneos recentemente mortos, em que não é possível excretar fezes: inocular soro fisiológico diretamente no abdômen do inseto, em seguida, repetir o item 8.3. Guardar o triatomíneo em microtubo de 1,5 ml, devidamente identificado, em freezer a -20°C

Utilizar uma gota de soro fisiológico sobre as fezes e espalhar com auxílio da agulha. Pôr a lamínula sob a lâmina e levar ao microscópio na objetiva de 40x.

Buscar formas flageladas, características de *Trypanosoma* sp., em diferentes campos, cobrindo toda a área da lamínula.

Após confirmação para formas flageladas, notificar o técnico responsável.

Para cultivo em meio de cultura, lavar a lâmina com soro fisiológico em placa de petri estéril.

Utilizar seringa estéril para fazer sucção do material da placa.

Transportar até a câmara de fluxo laminar – seguir protocolo de inóculo em meio de cultura por meio do POP



NOTA: A negatividade da lâmina não descarta a possibilidade de infecção. Verificar crescimento em cultura e/ou detecção por técnicas moleculares.

LIMITAÇÕES

Não é possível realizar este procedimento com triatomíneos secos há muito tempo.

REFERÊNCIAS

SILVA, I. G. LUQUETTI, A. O. SILVA, H. H. G. importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 26(1):19-24, 1993

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: Coleta de triatomíneos em campo, por busca ativa e uso de armadilhas		
Elaborado por: Rubens Celso Andrade da Silva Junior Laylah Magalhaes	Revisado e aprovado por:	Data de aplicação Abril de 2019 Data da próxima revisão

OBJETIVO

Capturar exemplares de triatomíneos para estudo de biologia e infecção natural.

DEFINIÇÕES

Triatomíneos: Na nossa região são tipicamente silvestres, isto é, espécies encontradas frequentemente em ecótopos naturais e, que raramente frequentam as habitações humanas e suas dependências. Consequentemente, de forma acidental, entra em contato com o homem e mamíferos domésticos, surgindo focos naturais.

APLICÁVEL

Coleta de triatomíneos em campo por busca ativa.

RESPONSABILIDADES

Gerente do laboratório de entomologia médica, técnicos, alunos de doutorado e mestrado.

POP'S RELACIONADOS

5.1 Criação de laboratório

COLETA POR BUSCA ATIVA

Equipamentos de proteção

Luvas

Calça e camisa de mangas longas

Sapato fechado

RECURSOS NECESSÁRIOS

Tubos de falcom 50ml

Pinças entomológicas
Placa de petri plástica
Lanternas
Caderno de anotações
Máquina fotográfica

PROCEDIMENTOS

Com a permissão do morador, verificar cada cômodo da casa, de maneira sistemática.

Verificar cada parede do cômodo existente na residência, verificando principalmente em locais escuros e que contenham objetos e móveis que possam albergar o inseto (Anexo B).

Ao encontrar um triatomíneo, usar pinça entomológica para captura, evitando seu desmembramento, colocando o inseto dentro do tubo falcon com tampa (Anexo B).

Identificar o tubo com endereço da residência, cômodo em que foi encontrado e eventuais circunstâncias.

Acondicionar em bolsa para transporte.

Encaminhar a amostra para a gerência de entomologia da FMTHVD.

Seguir protocolo de recepção e identificação triatomíneos Item 9.

LIMITAÇÕES

O tempo da equipe no imóvel pode ser insuficiente para encontro eventual do triatomíneo.

O morador tem maiores chances de encontrar o inseto, por morar no local.

Instruir o morador a capturar os insetos de forma correta.

Entregar material didático

COLETA COM ARMARDILHA NOIREAU

Equipamento de proteção individual
Luva de malha
Óculos de proteção
Camisas de manga longa e calça comprida
Botas

Equipamentos utilizados:

Haste de alumínio
Caderno de anotações
Armadilhas noireau (Anexo A)
Barbantes
Camundongos
Pincel 1.0
Bloco de etiqueta
Lápis
Borracha
Pinça de ponta fina
Terçado
Faca
Abobora ou ração
Máquina fotográfica
GPS
Pilhas

Fita dupla face
Estilete
Tubo falcon 50 mL

PROCEDIMENTOS

Material

Fazer todo o check-list dos materiais a serem utilizados um dia antes da coleta;
Arrumar todos os materiais de uso frequente na bolsa de coleta.

Reservar todos os materiais

Coleta triatomíneos

Escolher previamente as áreas de coletas, que contenham palmeiras com fenologia características para abrigo destes insetos;

Ao chegar ao local de coleta, selecionado previamente, deve-se aplicar o desenho experimental desenvolvido pelo grupo de pesquisa;

Iniciar a picada mata adentro, com auxílio de um terçado e uma bússola, anexando sempre o barbante no local selecionado, para demarcar e orientar a equipe dos dias decorrentes a coleta;

Tirar as coordenadas geográficas com o GPS, anotando no caderno de campo, bem como, gravando no aparelho;

Preparação das armadilhas

Após demarcar toda a área de coleta e seleção das palmeiras, preparar as armadilhas, envolvendo-as externamente com fita dupla face;

Adicionar um punhado de serragem, um camundongo e uma fatia de abóbora ou ração no interior da armadilha;

Instalar as armadilhas nas palmeiras ou locais selecionadas;

Fotografar o local onde as armadilhas estavam associadas para posterior identificação das espécies arbóreas;

Verificar as armadilhas diariamente, para troca de serragem e de alimentação;

Retirada de triatomíneos da armadilha




Os triatomíneos encontrados nas armadilhas serão coletados lentamente com auxílio de uma pinça de ponta fina, evitando seu desmembramento (Anexo B);

Os triatomíneos serão conduzidos ao tubo de falcon com papel de filtro devidamente identificado (área, data e associação de palmeira);

Ao final da coleta, detalhar todas as informações necessárias para o estudo (tipo de mata, temperatura, umidade).

REFERÊNCIAS

Jurberg J, Galvão C, Noireau F. Uma iconografia de Triatonineos. 2005. 48 p.

 <p>UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS</p>	 <p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO</p>	<p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	 <p>Grupo de Pesquisa em Dengue do Geopla Dr. João Afonso Prado Unidade de Entomologia, Instituto de Física, Universidade Federal do Amazonas</p>
<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP</p>			
<p>TÍTULO: Protocolo de reação de sequenciamento para analisador automático ABI 310</p>			
<p>Elaborado por: George Allan Silva Laylah Kelre Magalhães Adaptado por Débora Raysa Sousa</p>	<p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra Rosa Amélia Gonçalves Santana</p>	<p>Data de aplicação Abril de 2019</p> <hr/> <p>Data da próxima revisão Abril de 2020</p>	

OBJETIVO

Descrever o procedimento da reação de sequenciamento, utilizando o sequenciador automático ABI 310.

DEFINIÇÕES

O sequenciamento de DNA é o processo realizado após a PCR para se determinar a sequência exata de nucleotídeos em uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico). Isso possibilita identificar o organismo ao qual pertence uma amostra e diferenciar cepas de microrganismos patogênicos.

CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e diagnóstico laboratorial de pesquisa.

RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico.

POP'S RELACIONADOS

POP_ENT- Procedimento para extração de DNA por kit utilizando PureLink Kit® (Invitrogen).

POP_ENT- Procedimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*- Protocolo GPI (Gene da Glicose-fosfato isomerase).

POP_ENT- Protocolo de purificação para o sequenciamento: Precipitação de produto da PCR com Polienoglicol (PEG).

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO NECESSÁRIO

Jaleco, calçado fechado, máscara, luvas, touca

Placa com 96 poços

Reagentes do Mix	Quantidade 1x*
Água ultrapurificada**	3,7µL
Buffer 5X (Save Money)	2 µL
Primer (3,3 µM)	1 µL
Big Dye	0,3 µL
Volume do Mix***	7 µL
Amostra (produto da PCR purificado)	3 µL
Volume Total do Mix	10 µL

*Quantidade para uma amostra, que pode alterar, conforme a quantidade de amostras.

**A água é o reagente que altera a quantidade para que o volume final do mix + amostra seja 10 µL.

*** Muda dependendo da quantidade de amostra utilizado.

8.1.2. Depois de colocar o mix e as amostras na placa, é necessário lacrar a placa com a fita seladora e leva-lá ao termociclador;

8.1.3. Introduzir os tubos no termociclador programado para os seguintes ciclos de temperatura e tempo:

95°C	1 min	1X
95°C	15 seg	15X
55°C	10 seg	
60°C	1:15 min	
95°C	15 min	5X
55°C	10 seg	
60°C	1:30 min	
95°C	15 seg	5X
55°C	10 seg	
60°C	2min	
4°C	Infinito	

8.1.4 Após o término na reação no termociclador

Remover a placa do termociclador e encaminhar para a centrífuga, por 2 minutos, 2000 RCF a 4°C;

Obs: A placa deve sempre estar envolvida com o papel alumínio, evitando a luz.

Após a centrifugação, misturar, na mesma proporção, o EDTA 125mM e o acetato de sódio a 3M (ph 5,2). Adicionar em cada poço o EDTA e o acetato de sódio (1 µL de acetato + 1 µL de EDTA= 2 µL mix).

Ex: 700µL de EDTA e 700µL de acetato de sódio

Adicionar 25 µL de etanol 100% gelado a cada um dos poços;

Selar a placa com strips e misturar por inversão (4x) e manualmente;

Incubar, por 15 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo de luz e envolver a placa com papel alumínio;

Após o período de incubação, centrifugar, por 45 minutos, a 4°C a 2000 RCF ou 3000 RCF por 30 minutos;

Importante: O próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível. Fazer um spin na placa por +2 minutos, antes de iniciar a próxima etapa.

Inverter a placa manualmente e fazer um spin até 180 RCF, por 1 minuto, removendo-a da centrífuga;

Obs: A inversão desta placa deve ser manual, sobre uma pia, com um só movimento rápido, para evitar contaminação dos poços. Com a placa invertida sobre o papel toalha disposto na bancada, bata delicadamente por 8x, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

Adicionar 35 µL de etanol a 70% em cada um dos poços;

Obs: Utilizar pipeta multicanal.

Centrifugar, por 15 minutos, a 4°C e 1650 RCF;

Inverter a placa manualmente e fazer um spin, até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa centrifuga;

Obs: A inversão desta placa deve ser manual, sobre uma pia, com um só movimento rápido, para evitar contaminação dos poços. Com a placa invertida sobre o papel toalha disposto na bancada, bata delicadamente por 8x, para retirar o excesso de etanol e fazer um spin de 1 minuto.

Incubar a placa a 52°C por 15 minutos;

Obs: Cobrir a placa somente com papel alumínio em forma de cabana (no próprio termociclador com a tampa aberta).

Importante: Caso não for colocar a placa no sequenciador, imediatamente, colocar o selo, com a placa seca, envolve-na com o papel alumínio para protegê-la da luz e congele-a.

Acrescentar em cada poço 10µL de formamida HI-DI, lavando as paredes dos poços. Selar e fazer um spin;

Obs: Tentar utilizar somente uma unidade de ponteira, de forma que não entre em contato com poço.

Aquecer a placa 95°C por 1 minuto e depois mais 1 minuto no gelo, em seguida enviar a placa para o sequenciador.

Obs: Sempre colocar a placa em par, pois os capilares fazem a leitura em pares.

PADRÃO E MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não se aplica

10.LIMITAÇÕES

Não se aplica


11.REFERÊNCIAS

Nonohay, JS; Hepp, D. Técnicas e análises de Biologia Molecular.

Biotecnologia II. Capítulo 1, 1-23. Disponível em:

<http://srvd.grupoa.com.br/uploads/imagensExtra/legado/B/BRUNO_Alessandra_Nejar/Biotecnologia_II/Lib/Amostra.pdf>.

Silva, GAV; Ramasawmy, R; Boechat, AL, et al. Association of TNF À 1031 C / C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. Human. Immunology. 2015;76, (2-3):137- 141.

	Fundação Oswaldo Cruz Laboratório de Ciências Biológicas Escola Nacional de Saúde Pública	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP TÍTULO: Protocolo da técnica ELISA – Detecção de fonte alimentar		

Material necessário

Obs. Se houver risco químico ou biológico, advertir quanto aos cuidados necessários

Obtenção dos Antígenos:

As proteínas utilizadas como antígenos são obtidas a partir da coleta de sangue de animais que atuam como possíveis hospedeiros dos insetos analisados. Após a coleta, deixar a amostra de sangue na temperatura ambiente para retração do coágulo. Centrifugar a 3000 g, durante 10 minutos, para separação do soro. Estocar o soro a – 20°C até o momento do uso.

Produção dos anti-soros:

Inocular coelhos da linhagem Nova Zelândia, com peso superior a 2 kg com antígenos do soro de animais, que atuem como possíveis fontes de alimentação.

Misturar 500 µL do soro com 500µL de adjuvante de Freund, completo na primeira inoculação e, incompleto nas inoculações subsequentes.

Os inóculos deverão ser feitos a cada 7 dias, por via intramuscular por um período de, aproximadamente, 3 semanas.

Sangria e avaliação dos soros:

Após 10 dias do término do esquema de imunização, fazer a sangria do coelho por meio de punção da veia marginal da orelha para verificação dos títulos dos anti-soros pelo método de precipitação. Caso os títulos obtidos sejam satisfatórios, realizar o dessangramento com eutanásia seguindo os protocolos aprovados pela comissão de ética animal (CEUA – FIOCRUZ).

Preparo das amostras:

4-a: Material necessário:

Lâminas de microscopia escavadas

Microscópio estereoscópico

Pinças e estilete

Micropipetas de volume ajustável de 10 a 100 μL

Ponteiras descartáveis

Solução Salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2 – 0,01 M

Microtubos de 500 μL

4b - Coleta dos materiais

Após capturados e identificados, dissecar os insetos, com o auxílio do microscópio, pinças e estilete, separando o abdômen do tórax. O abdômen é dissecado e o conteúdo do tubo digestivo é macerado com 100 μL de PBS. Esta amostra deverá ser armazenada em freezer a -20°C até o momento da análise.

5-TESTE

Sensibilização das placas

Placas de poliestireno de 96 poços, sensibilizadas com 50 μL de amostra diluída a 1:20 em tampão carbonato bicarbonato. Após a colocação das amostras, as placas permanecem em câmara úmida por 2 horas em estufa a 37°C .

Colocação dos antissoros

Após o período de sensibilização, a placa é lavada em lavadora de microplacas com PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%.

Soros de coelho imunizado com diferentes antígenos dos soros animais (anti-soro), pesquisados como fonte alimentar, são diluídos a 1:2000 em PBS/Tween 20, acrescidos de leite em pó desnatado, na proporção a 1% (Tampão de diluição).

São colocados 100 μ L de anti-soro diluído em contato com a amostra diluída. Segue-se um período de incubação de 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Após a incubação, ocorre nova lavagem da placa nas mesmas condições descritas anteriormente.

Colocação do conjugado

Em seguida, é feita uma solução contendo conjugado diluído (IgG de cabra anti-Ig total de coelho conjugada a peroxidase-Sigma Chemical USA) em tampão de diluição a 1:20000. São colocados 100 μ L desta solução em cada poço da placa.

Novo período de incubação é realizado como descrito na etapa anterior

Revelação do Teste

Após o período de incubação com o conjugado, segue-se nova lavagem, como já descrita, e inicia-se a etapa de revelação dos resultados.

Em cada poço da placa são colocados 100 μ L de tampão de revelação, que consistem em uma solução contendo 25 mL de tampão citrato-fosfato, 10 μ L de água oxigenada 30 vol. e 10 mg de OPD (ortophenilene di-amine Sigma Chemical USA).

Segue-se um período de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir, são colocados 50 μ L de solução de ácido sulfúrico 1N para bloqueio da reação e posterior leitura em leitora de microplacas, utilizando filtros de 490nm.

Interpretação dos resultados

Após realização de análises estatísticas, considera-se que somente as amostras com valores de absorvância superiores ao valor de cut off* serão interpretadas como positivas.

*Valores médios de absorvância obtidos a partir dos controles negativos somados a 3 desvios padrão.

Obs: Em cada placa são utilizados, como controles positivos, os antígenos utilizados para imunização dos coelhos. São esperados para validação dos controles positivos leituras de absorvância superiores a 1,0.

Como controles negativos são utilizados insetos não alimentados ou soros heterólogos utilizados no teste.

6- SOLUÇÕES UTILIZADAS:

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M pH 7,2 a 7,4

NaCl -----	16,36 g	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄ (7H ₂ O) -----	3,98 g	fosfato de sódio dibásico
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) -----	0,71 g	fosfato de sódio monobásico

H₂O destilada -----qsp----- 2 L

Pesar os reagentes em recipientes independentes, limpos e secos.

Diluir os reagentes, pesados em becker de 1L, contendo água destilada em volume necessário para total dissolução dos reagentes.

Após dissolução dos sais, verificar o pH que deverá estar na faixa de 7,2.

Transferir a solução para balão volumétrico e completar o volume para 2 litros com água destilada.

Verter a solução para recipiente com etiqueta de proteção transparente e impermeável, descrevendo data do preparo e nome do preparador.

Tampão citrato-fosfato pH 4,9 – 5,2 (para DAB e OPD)

Solução fosfato :

NaH₂PO₄ . H₂O ----- 11,9 g

NaH₂PO₄ . 7H₂O ----- 22,2 g

Pesar o reagente abaixo e diluir em 1 litro de água destilada

Solução citrato :

Ácido cítrico ----- 7g

q.s.p. 1 litro de água destilada

Preparo do tampão:

Colocar 1 parte de ácido + 9 partes de fosfato

Medir o pH que deve estar entre 4,9-5,2; se <4,9 titular com solução fosfato; se

>5,2 titular com a solução de ácido cítrico até atingir pH na faixa de 4,9-5,2

Tampão carbonato-bicarbonato pH9,6 - 0,06M

NaH₂CO₃ - Bicarbonato de sódio :

84,1 -----1 M

X ----- 0,06 M

X = 5,0406g para 0,06 M

Pesar 5,0406g de bicarbonato de sódio e diluir em 1 litro de água destilada

Na₂CO₃ - Carbonato de sódio:

105,99 ----- 1 M

X ----- 0,06 M

X= 6,3594g para 0,06 M

Pesar 6,3594 g de carbonato de sódio e diluir em 1 litro de água destilada

Em um becker, colocar 1 parte de carbonato + 4 partes de bicarbonato de sódio. Verificar o pH que deverá estar na faixa de 9,6. Se estiver maior, colocar bicarbonato; se estiver menor, colocar carbonato.

Tampão de lavagem (PBS TWEEN)

Tween 20-----1 mL

PBS 0,01M pH 7,2-7,4 -----qsp-----2L

Medir 1mL de Tween 20 com pipeta e adicionar a 2L de PBS

Solução reveladora (ELISA)

OPD ----- 0,01g

Tampão citrato-fosfato pH 5,1 ----- 25 mL

Diluir o OPD no tampão citrato-fosfato e adicionar 10µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Tampão de diluição (PBS TWEEN - leite)

A cada 100 mL de tampão de lavagem (PBS tween), acrescentar 1 g de leite em pó desnatado (Molico).

Misturar e filtrar com filtro de papel.

Solução bloqueadora (ELISA) - H₂SO₄ 1N

7.2 Autorização – IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12364-1	Data da Emissão: 03/09/2007 14:30	Data de Validade: 02/09/2008
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1830651	Nome: Maria das Graças Vale Barbosa	CPF: 068.611.212-15
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS		CNPJ: 04.534.053/0001-43

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Médico	052.753.182-00	341884-7 assag-AM	Brasileira
2	Betina Maria Lopes Magalhães	Enfermeira	065.377.096-01	2188768 SSP-DF	Brasileira
3	Suziane Ribeiro Prestes	Bióloga	792.550.432-34	1753215-8 SSP-AM	Brasileira
4	Layrah Katre Costa Magalhães	Bióloga	746.457.372-33	1657719-8 SSP-AM	Brasileira
5	Nelson Ferreira Fe	Tecnologista	022.620.812-20	75810-5 SESE-AM	Brasileira
6	Marcel Gonçalves Maciel	Bolsista de Iniciação Científica	684.138.072-04	1821179-6 ssp-AM	Brasileira
7	Via Cabral de Rodrigues	Bióloga	641.313.182-68	1384613-2 SE-SP-AM	Brasileira
8	Maurício Barbosa de Medeiros	Médico	831.386.524-68	157669 SSP-PB	Brasileira
9	Cláudio Maciel Cezano	Bolsista de Iniciação Científica	767.864.952-68	15373212 assag-AM	Brasileira
10	Marilaine Martins	Bióloga	020.780.418-60	12600325 SSP-SP	Brasileira
11	Leila Inês de Aguiar Raposo da Câmara Coelho	Bioquímica	075.856.402-34	182203-9 SSP-AM	Brasileira
12	MARCIO PEREIRA FABIANO	Bolsista de Iniciação Científica	866.181.062-04	1821179-6 SSP-AM	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo local
1	MANAUS	AM	Amazonas	Foto de UC
2	COARÁ	AM	Amazonas	Foto de UC
3	TSFÉ	AM	Amazonas	Foto de UC

Atividades	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ, Captura de animais silvestres in situ, Coleta/transporte de espécimes de fauna silvestre in situ
------------	--

Atividades X Taxões

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154, de 01 de março 2007, publicada no DCU do dia 02/03/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93796789



Página 1/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12364-1	Data da Emissão: 03/09/2007 14:30	Data de Validade: 02/09/2008
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 1830651	Nome: Maria das Graças Vale Barbosa	CPF: 068.611.212-15
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS		CNPJ: 04.534.053/0001-43

Atividade	Taxona
Captura de animais silvestres in situ	Xenarthra, Insecta, Rodentia, Didelphimorphia
Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Didelphimorphia, Rodentia, Xenarthra, Insecta
Coleta/transporte de espécimes de fauna silvestre in situ	Xenarthra ("Órde: 2"), Rodentia ("Órde: 8"), Insecta ("Órde: 13"), Didelphimorphia ("Órde: 5")

* Oito de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Materiais e métodos

Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Pele, Sangue
Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta, Pupa, Captura manual
Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Bos Trap/Tomahawk/Steppan")

Destino dos materiais biológicos coletados

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS	Centro de Entomologia

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154, de 01 de março de 2007, publicada no DOU do dia 02/03/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93796789



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12364-1	Data da Emissão: 03/09/2007 14:30	Data de Validade: 02/09/2008
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1830651	Nome: Maria das Graças Vale Barbosa	CPF: 068.611.212-15
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS		CNPJ: 04.534.053/0001-43

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154, de 01 de março 2007, publicada no DOU do dia 02/03/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtd.	Amostra	Qtd.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154, de 01 de março 2007, publicada no DOU do dia 02/03/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93796789



Página 3/3

APROVAÇÃO COMISSÃO DE ESTUDO COM USO DE ANIMAIS – CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMT-HVD)

PARECER

Processo Nº 003968/2016 FMT-HVD, de 19/09/2016.

Título do Projeto indicado no Formulário: Doença de Chagas no Estado do Amazonas: ecologia dos ciclos de transmissão dos Municípios de Manaus, Coari e Tefé

Interessada: Maria da Graças Vale Barbosa Guerra

Do preenchimento do Formulário Unificado para solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino e/ou Pesquisa – Anexo I

Todos os itens foram preenchidos e atendidos.

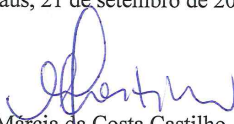
O referido projeto é parte integrante como do projeto: Estudo eco-epidemiológico e clínico, dinâmica da transmissão e perspectiva de vigilância e controle da infecção chagásica em área dos rios Negro, Solimões e Trombetas, nos Estados do Amazonas e Pará

Instrução: A equipe do projeto possui experiência no manuseio de animais, de biotério, em específico camundongo. Destaca-se a presença do médico veterinário, na equipe, a fim de garantir às orientações, supervisões e prescrições necessárias, para o melhor manejo dos animais. Anexo, são apresentadas as - Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), Números 12364-1, de 03/09/2007 e 12364-2, de 27/08/2008 para captura de animais silvestres. Além de Aprovação Nº 1836, de 07/02/2007, sob registro no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos/FMT-AM Nº 0360-07.

As atividades do projeto iniciaram no ano de 2007, portanto, anterior à data de vigência da Lei 11.794, de 08/10/2008 e da sua regulamentação pelo Decreto 6.899, de 15/07/2009, da obrigatoriedade das Instituições a implantações de CEUAs pelas Instituições, o que o torna dispensável à luz da Lei.

Este é o parecer, s.m.j.

Manaus, 21 de setembro de 2016.


Márcia da Costa Castilho
Membro/Relatora





CEUA

FMT-HVD

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Doença de Chagas no Amazonas: ecologia dos ciclos de transmissão nos municípios de Manaus, Coari e Tefé ", registrada com o nº **0039682016.008**, sob a responsabilidade de Maria das Graças Vale Barbosa Guerra - que envolve a utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em reunião de 23/09/2016.

Vigência da Autorização	
Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	12364-1 e 12364-2
Atividades:	<input checked="" type="checkbox"/> Captura <input type="checkbox"/> Coleta de espécies <input checked="" type="checkbox"/> Marcação <input checked="" type="checkbox"/> Outras: uso de roedores como isca
Espécies/Grupos Taxonômicos	Marsupiais e Roedores
Local(is) de realização das atividades	Manaus, Coari e Tefé

Data de liberação do Parecer: 23 de setembro de 2016


José Anselmo d'Affonseca Neto

Presidente em exercício - CEUA-FMT-HVD

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
AV. PEDRO TEIXEIRA, 25 – BAIRRO D. PEDRO I – CEP 69.040-000 – MANAUS-AMAZONAS-BRASIL
FONE (0XX92) 2127-3402 – PABX (0XX92) 2127-3555 Ramal 3402
E-mail: fmt@fmt.am.gov.br - Homepage: www.fmt.am.gov.br