

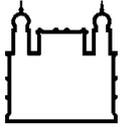
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**DISTRIBUIÇÃO, INFECÇÃO NATURAL E FONTES
ALIMENTARES DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS EM
MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E AÇÕES
EDUCATIVAS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DA DOENÇA DE
CHAGAS**

NATHANIELLY ROCHA CASADO DE LIMA

Rio de Janeiro
Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

NATHANIELLY ROCHA CASADO DE LIMA

**DISTRIBUIÇÃO, INFECÇÃO NATURAL E FONTES ALIMENTARES DE
TRIATOMÍNEOS COLETADOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL E AÇÕES EDUCATIVAS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet
Prof. Dr^a Ana Laura Carbajal de La Fuente

RIO DE JANEIRO
Março de 2017

Lima, Nathanielly R C .

Distribuição, infecção natural e fontes alimentares de triatomíneos coletados em municípios do estado do Rio Grande do Sul e ações educativas na prevenção e vigilância da doença de Chagas / Nathanielly R C Lima. - Rio de Janeiro, 2017.

103 f.; il.

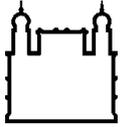
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Jacenir Reis Santos-Mallet.

Co-orientadora: Ana Laura Carbajal de la Fuente.

Bibliografia: f. 80-100

1. Infecção natural. 2. Fonte alimentar. 3. Morfologia. 4. Vigilância epidemiológica. 5. Ações educativas. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: NATHANIELLY ROCHA CASADO DE LIMA

**DISTRIBUIÇÃO, INFECÇÃO NATURAL E FONTES ALIMENTARES DE
TRIATOMÍNEOS COLETADOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL E AÇÕES EDUCATIVAS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Orientador (es): Prof. Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet
Prof. Dr^a Ana Laura Carbajal de La Fuente

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Dr. Cleber Galvão - IOC/ FIOCRUZ – Presidente e revisor
Dra. Jane Costa - IOC / Fiocruz
Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva - UNIRIO
Dra. Maria Denise Feder - UFF
Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

SUPLENTES:

Dr. Cícero Brasileiro - UFF
Dr. Jeronimo Alencar - IOC/ FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 10 de março de 2017

Dedico,

aos meus pais, por toda dedicação que tiveram pela minha educação e formação.

Por tudo que deixaram de ganhar para me dar.

E graças ao esforço deles, consegui concluir mais uma etapa da minha vida.

Obrigada por tudo que foram, são e serão ainda pra mim. Amo vocês mais que tudo nessa vida.

À Drª Jacenir Mallet,

por tudo que ela fez e ainda é capaz de fazer por mim, com sua calma e determinação me confortou nos momentos em que mais precisei. Graças a sua persistência e atenção, não desisti de realizar mais esse sonho. À minha orientadora que para mim sempre será exemplo de ser humano e profissional. Muito obrigada Jace, pois o fato de você ter confiado em mim me fez chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me ajudando, amparando, protegendo e dando forças para que eu nunca desanimasse e sempre continuasse em frente na busca dos meus objetivos.

À minha família, em especial aos meus pais tão queridos e amados Antônio e Margareth por sempre me darem total apoio em todas as etapas da minha vida, pela paciência nos momentos mais difíceis, pelo amor incondicional e por tudo que ainda serão capazes de fazer por mim.

Aos meus irmãos Toni e Max pelo amor, carinho, incentivo e muita paciência nos momentos mais difíceis e a minha cunhada Anne Caroline por toda sua cumplicidade. Obrigada por tudo.

À minha sobrinha Manuela, por ter me ensinado um amor puro, verdadeiro e imensurável.

Ao meu avô Francisco Rocha da Silva e em especial a minha avó Ivete Chaves Rocha (in memoriam), por todo seu apoio, carinho, dedicação e por toda torcida em relação a minha vida acadêmica. Tenho certeza que ela está muito orgulhosa e torcendo muito por mais essa etapa concretizada.

Aos meus avós Joel Casado e Cícera do Carmo (in memoriam) por todos os momentos que passamos juntos e sei que onde eles estão e sempre estarão torcendo por mim.

As minhas tias, Lilisbete, Elizabeth, Franciete, Darniete e a minha tia-avó Diná por todo apoio, carinho e torcida em cada momento da minha vida. Amo vocês demais.

Ao meu amor, parceiro, companheiro e amigo Marcelo Oliveira Mendonça, que esteve sempre ao meu lado, compreendendo a minha ausência e as minhas crises. Mesmo com tudo isso, sempre me mostrava o lado bom das coisas e que com fé, tudo seria possível. Obrigada por tudo meu amor!

A minha querida orientadora Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet, carinhosamente chamada por mim de “passalinha” e que é uma mãezona para seus alunos, por tudo que fez por mim, pelos momentos que me ouviu e mesmo eu não sendo muito doce nas palavras sempre me compreendeu e me mostrou que devemos esperar e nunca desistir dos nossos sonhos. Muito obrigada pela confiança em mim depositada, pelo otimismo nos momentos de crise e por toda sua paciência nos momentos em que mais precisei.

À minha co-orientadora Ana Laura Carbajal de La Fuente, que mesmo distante fisicamente, sempre se manteve presente através de seu apoio e ensinamentos preciosos desde sempre na minha vida acadêmica, não só para a realização dessa tese, mas desde o meu ingresso no laboratório. Obrigada Aninha!

À Rosemere Duarte por toda sua ajuda, amizade e colaboração na preparação deste trabalho. Muito obrigada pelo carinho de me atender sempre que foi preciso!

À amiga Margareth Cardozo de Almeida que também foi fundamental para a realização desta tese, através de seu apoio, conselhos e ensinamentos que esta foi concretizada. Muito obrigada amiga por tudo.

Ao Mário Brito de Oliveira, que foi muito mais que um agente de saúde, foi amigo, parceiro, companheiro e peça fundamental para a realização das coletas e com toda sua experiência nos ensinou toda a vivência de campo. Obrigado seria pouco para agradecer tudo que fez por nós.

À Isabel e D. Dodô, por ter nos acolhido como membro da família durante esses dois anos de coleta. Além do trabalho realizado, ganhamos uma família no Sul. Muito obrigada por todo cuidado e carinho.

À D. Neiva, uma mulher de uma força incrível que nos acolheu em sua casa como se fôssemos suas filhas, nunca esquecerei todo carinho e amizade.

À minha grande amiga-irmã Maria Luiza, que além de amiga foi minha parceira incansável nas coletas de campo, estando presente durante todas as etapas dessa tese.

Obrigada por fazer parte não só da minha vida acadêmica, mas da minha vida pessoal.
Te amo minha eterna Malu.

Ao mestre e amigo Alexandre de Araújo, pela infinita ajuda na reta final deste trabalho, ofertando todo seu conhecimento em estatística. Muito obrigada!

À mestre Thaianne Verly, pela amizade e colaboração nos trabalhos de campo e nas análises moleculares. Muito obrigada por tudo!

À Dr^a Constança Britto por sua colaboração e apoio para a realização desta tese.

A minha grande amiga-irmã Luciana Reboredo por toda amizade, apoio, incentivo. Obrigada por tudo minha eterna amiga.

A minha grande amiga Simone Castro pela amizade, apoio, incentivo e pelas vezes que sempre me ouviu, me dando conselhos para agir da maneira correta. Obrigada por tudo minha grande e eterna amiga.

À Dr^a Catarina Macedo Lopes, pelos ensinamentos, ajuda, apoio e incentivo desde a minha entrada no laboratório. Obrigada minha eterna Catarinona.

A Dr^a Teresa Cristina Monte Gonçalves, Dr^a Simone Patrícia Carneiro de Freitas e Dr^a Suzete Araújo Oliveira Gomes pelo apoio, incentivo e palavras de carinho.

À amiga Simone Teves por ser tão dedicada e atenciosa com todos do laboratório, pelas palavras de apoio e carinho.

Aos amigos William Marques e Michele Serdeiro, pela amizade e companheirismo durante as inúmeras disciplinas que fizemos juntos. Obrigada por tornarem esse momento mais leve.

Aos companheiros do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Epidemiológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH), pelo auxílio e amizade em todos momentos.

À minha vizinha do coração Alcidinéia Ivo, por todo seu ensinamento, experiência e paciência para me ensinar tudo que sei sobre laboratório, desde limpeza de vidraria até o trabalho de bancada. Alguém que eu recorria nos momentos de angústia e que sempre me defendeu diante de todos. Muito obrigada minha eterna Néia, a quem eu amo como se fosse minha verdadeira avó.

À secretária Ester Lúcia (in memoriam) pela alegria em realizar qualquer pedido, e mesmo estando em outro plano, ainda se faz presente.

À Lívia, secretária da Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela atenção e ajuda sempre que requisitada.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, por todos os preciosos ensinamentos.

À coordenadora da Pós-Graduação em Medicina Tropical Dr^a Martha Cecília Suarez-Murtis, pela sua atenção e carinho em resolver as questões burocráticas.

À Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, em especial à Cleonara Bedin que atua no Programa de Controle da Doença de Chagas na Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde do Centro Estadual de Vigilância em Saúde, pelo apoio estrutural para que esse projeto pudesse ser realizado.

A toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Epidemiológica em Diptera e Hemiptera (LIVEDIH) pela união, apoio e ensinamentos.

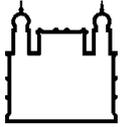
Aos amigos e colegas por sempre acreditarem que o sorriso, a sinceridade e o amor são a salvação da alma.

A fonte financiadora Capes.

A Fiocruz pela excelência em pesquisa e por fornecer subsídios fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

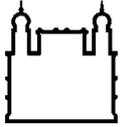
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DISTRIBUIÇÃO, INFECÇÃO NATURAL E FONTES ALIMENTARES DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E AÇÕES EDUCATIVAS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Nathanielly Rocha Casado de Lima

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada. Trata-se de uma infecção crônica e potencialmente fatal, causada pelo protozoário *T. cruzi* e transmitida por triatomíneos. Os triatomíneos do Sul mostram uma grande diversidade de espécies, incluindo *T. infestans*, *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi* e *T. circummaculata*. O objetivo geral foi realizar um estudo multidisciplinar com abordagem biológica, morfométrica e molecular em triatomíneos coletados no Rio Grande do Sul, implementando ações educativas de saúde, atendendo as ações do Plano Brasil sem Miséria. Objetivos específicos: verificar a distribuição de triatomíneos coletados em 06 municípios, avaliando o grau de infestação do peri e intradomicílio, analisar o conteúdo do tubo digestivo identificando sua fonte alimentar, avaliar o índice de infecção natural por *T. cruzi* nos triatomíneos capturados nos diversos ambientes, comparar e determinar possíveis diferenças entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* através da morfometria clássica, avaliar aspectos sobre a biologia de *T. carcavalloi* e informar e sensibilizar a população quanto à importância da vigilância entomológica. As coletas foram realizadas entre 2013 e 2016, obtendo-se 2112 exemplares. Os municípios com os maiores números de triatomíneos coletados foram Lavras do Sul (1025) e Caçapava do Sul com 389. Para avaliação de infecção por *T. cruzi* quatrocentos exemplares de triatomíneos foram analisados sendo 33 *T. carcavalloi*, 9 *T. circummaculata*, 7 *T. rubrovaria*, 123 *T. infestans*, e 228 exemplares de ninfas. O exame à fresco realizado foi negativo para as três espécies do complexo rubrovaria, só sendo encontrada positividade em dois exemplares adultos de *T. infestans* (6,7%), enquanto que no diagnóstico molecular 30 amostras foram positivas e 370 negativas. A presença de *T. Infestans* infectados chama a atenção para a vigilância entomológica sobre esta espécie. Na avaliação da fonte alimentar através de obtenção de fezes dos triatomíneos obteve-se 24,5% amostras positivas para ave (mais frequente), ovelha e roedor e 55,5% negativas. Utilizando a dissecação do intestino, avaliou-se 224 exemplares (223 ninfas e 2 adultos da espécie *T. rubrovaria*), onde 75,6 % apresentaram reatividade para um ou mais dos antissoros testados, 24,4 % não apresentaram reatividade. A fonte alimentar mais frequente foi ave (84,7 %) e ovelha (7,3 %) e em 12,8 % observou-se reatividade para mais de uma fonte. A estatística descritiva mostra que os valores obtidos para as quinze variáveis métricas nas amostras apresentaram variabilidade em todas. Dados sobre a biologia de *T. carcavalloi* mostram este requer vários repastos sanguíneos para realização da ecdise e os machos exibem menor resistência ao jejum que as fêmeas, o que pode representar uma maior busca por fontes alimentares. A capacidade de transmissão da doença de Chagas mostrada por *T. carcavalloi* é tão elevada quanto a de *T. rubrovaria*, enquanto *T. circummaculata* se infecta menos, provavelmente devido ao fato de se alimentar com menos frequência em mamíferos. Foram aplicados 74 questionários em 123 unidades domiciliares, onde, por exemplo, mais de 90% reconheceu um triatomíneo adulto, mas não a ninfa e 70% sabiam dizer o nome da doença transmitida pelo barbeiro. Nas oficinas e palestras a aplicação de pré-teste e pós-teste na avaliação dos conhecimentos mostrou a positividade destas atividades na contribuição para as ações de vigilância e controle dos triatomíneos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DISTRIBUTION, NATURAL INFECTION AND FOOD SOURCES OF TRIATOMINAE
COLLECTED IN MUNICIPALITIES OF THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL AND
EDUCATIONAL ACTIONS IN THE PREVENTION AND SURVEILLANCE OF CHAGAS DISEASE

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Nathanielly Rocha Casado de Lima

Chagas disease is considered a neglected tropical disease. It is a chronic and potentially fatal infection caused by protozoan *T. cruzi* and transmitted by triatominae. Triatominae in the State of Rio Grande do Sul shows a great diversity including *Triatoma infestans*, *Triatoma rubrovari*, *Triatoma carcavallo* and *Triatoma circummaculata*. Thus, the overall objective was to conduct a multidisciplinary study with biological, morphometric and molecular approach in triatominae collected in RS and, moreover, implement educational activities to contribute to the prevention of Chagas disease in the State, taking into account the actions of Plano Brasil sem Miséria (Brazil without Misery Plan). Specific objective: to verify the distribution of triatominae collected in 06 municipalities with assessment of the degree of infestation of peri and intradomicile, detect the possible hosts and/or reservoirs of triatominae, by examining the contents of the digestive tract of triatominae identifying their food source, assess rate of natural infection by *Trypanosoma cruzi* in triatominae captured in wild environments, peri and intradomicile, compare and determine possible differences among the species *T. carcavallo*, *T. circummaculata* and *T. rubrovaria* through classic morphometry, evaluate some aspects of the biology of *Triatoma carcavallo* and inform and sensitize the population about the importance of entomological surveillance. Collections were made between 2013 and 2016, and 2112 specimen were obtained. Municipalities with the largest numbers of triatominae collected were Lavras do Sul (1025) and Caçapava do Sul (389). In order to evaluate the infection with *T. cruzi* 400 specimen of triatominae were analyzed, and 33 from *T. carcavallo*, 9 from *T. circummaculata*, 7 from *T. rubrovaria*, 123 from *T. infestans* and 228 specimens of nymphs. The fresh test was negative for the three species of rubrovaria complex, positivity was only found positive on two adult specimens of *T. infestans* (6.7%), while in molecular diagnostic 30 samples were positive and 370 were negative. The presence of infected *T. Infestans* draws attention to entomological surveillance on this species. In assessment of food source through obtaining feces from triatominae it was obtained 24.5% of positive samples for bird (more frequent), sheep and rodent and 55.5% were negative. Using the dissection of the intestine, 224 specimens were evaluated (223 nymphs and 2 adults of the species *T. rubrovaria*), where 75.6% showed reactivity to one or more of antiserum tested, 24.4% did not present reactivity. The most frequent food source was bird (84.7%) and sheep (7.3%) and it was observed in 12.8% reactivity for more than one source. The descriptive statistics shows that the values obtained for the fifteen metric variables in samples showed variability in all of them. Data on the biology of *T. carcavallo* shows that it is required multiple blood meals so that ecdysis is performed and males exhibit less resistance to fasting than females, which may represent a greater search for food sources. The capacity of transmission of Chagas disease shown by *T. carcavallo* is as high as that of *T. rubrovaria*, while *T. circummaculata* is less infected, probably due to the fact that it feeds less frequently in mammals. It was applied 74 questionnaires in 123 households, where for example over 90% recognized an adult triatominae, but not the nymph, and 70% know the name of the disease transmitted by barber bug. In workshops and lectures, the application of pre-test and post-test in knowledge assessment showed the positivity of these activities to contribute to the actions of surveillance and control of triatominae.

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A doença de Chagas.....	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	2
1.3. Triatomíneos.....	3
1.3.1. Triatomíneos do estado do Rio Grande do Sul.....	5
1.4. O Plano Brasil Sem Miséria.....	13
1.4.1 - A doença de Chagas no contexto do BSM.....	14
1.5. Educação em saúde como suporte às ações do BSM.....	15
1.6. Justificativa.....	17
2.0. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Caracterização das áreas de estudo.....	20
3.1.1. Estudo de campo.....	20
3.1.1.1. <u>Cachoeira do Sul</u>	20
3.1.1.2. <u>Caçapava do Sul</u>	20
3.1.1.3. <u>Canguçu</u>	21
3.1.1.4. <u>Encruzilhada do Sul</u>	21
3.1.1.5. <u>Lavras do Sul</u>	21
3.1.1.6. <u>São Jerônimo</u>	22
3.1.2. Averiguação de foco de triatomíneos.....	22
3.1.2.1. <u>Santa Rosa</u>	22
3.1.3. Coleta dos triatomíneos.....	24
3.1.4. Identificação dos insetos.....	25
3.1.5. Manutenção dos insetos na colônia.....	25
3.1.6. Identificação da presença de infecção por tripanosomas utilizando Microscopia ótica.....	26
3.1.7. Avaliação das taxas de infecção natural e da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> em triatomíneos de campo por PCR.....	27
3.1.7.1. <u>Extração de DNA</u>	28
3.1.7.2. <u>Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCRc)</u>	28
3.1.7.3. <u>Eletroforese em gel de agarose</u>	29

3.1.7.4. <u>Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)</u>	29
3.1.7.5. <u>Curva padrão</u>	30
3.1.7.6. <u>Cultivo de células para curva padrão e controles da PCR</u>	31
3.1.7.7. <u>Análise estatística</u>	31
3.1.8. Avaliação da fonte alimentar através de teste imunoenzimático.....	31
3.1.8.1. <u>Primeira Etapa de Coleta (Análise através das fezes dos triatomíneos)</u> ...	31
3.1.8.2. <u>Segunda Etapa de Coletas (Análise do conteúdo intestinal dissecado)</u>	32
3.1.9. Aspectos sobre a biologia de <i>Triatoma carcavalloi</i>	34
3.2. Atividades de educação	35
3.2.1. Atividade de Divulgação para a população.....	35
3.2.2. Atividade de Capacitação com Integrantes da área de saúde dos municípios	36
4.0 – RESULTADOS	37
4.1. Análise da fauna de triatomíneos	37
4.1.1. Triatomíneos coletados nas expedições de campo.....	37
4.1.2. <i>T. infestans</i> coletados em foco no Município de Santa Rosa.....	48
4.1.3. Análise do total da fauna de Triatomíneos obtida no estudo de campo e no foco.....	50
4.2. Avaliação da infecção por <i>T. cruzi</i>	51
4.3. Avaliação da Fonte Alimentar	53
4.4. Biologia de <i>Triatoma carcavalloi</i>	57
4.5. Atividade de educação em Saúde	61
4.5.1 Divulgação para a população.....	61
4.5.2. Atividade de Capacitação para Profissionais da área de saúde.....	64
5.0. DISCUSSÃO	67
5.1. Taxa de infecção dos triatomíneos	68
5.2. Identificação da fonte alimentar	69
5.3. Biologia	72
5.4. Atividades de Educação em Saúde	76
6.0. CONCLUSÕES	78
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8.0. ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Triatoma rubrovaria</i>	7
Figura 2 – <i>Triatoma carcavalloi</i>	8
Figura 3 - <i>Triatoma circummaculata</i>	9
Figura 4 – <i>Triatoma infestans</i>	10
Figura 5 - Mapa da transmissão por <i>Triatoma infestans</i> nas Américas.....	12
Figura 6 - Mapas do Estado do Rio Grande do Sul, destacando-se os municípios de Cachoeira do Sul (a), Caçapava do Sul (b), Canguçu (c), Encruzilhada do Sul (d), Lavras do Sul (e) e São Jerônimo (f), onde foi realizado o Estudo de campo.....	23
Figura 7 - Mapa do Estado do Rio Grande do Sul, onde destaca-se o município de Santa Rosa, local de averiguação do foco de triatomíneos.....	24
Figura 8 - Frascos contendo os insetos identificados.....	25
Figura 9 - Manutenção dos insetos na colônia.....	26
Figura 10 - Sequência demonstrativa (a-e) do exame parasitológico das fezes dos insetos.....	27
Figura 11 - Pontos de coleta dos triatomíneos no estado de Rio Grande do Sul....	38
Figura 12 - Porcentagem relativa ao total de insetos obtidos nos seis municípios do estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2013 e 2014, de acordo com o estágio de desenvolvimento.....	39
Figura 13 - Total consolidado de ninfas (N1 a N5) coletadas em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2015 e 2016.....	40
Figura 14 - Total consolidado de adultos (machos e fêmeas) coletados em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2015 e 2016.....	40
Figura 15 - Gráfico contendo a média de temperatura, temperatura máxima e mínima e precipitação nos anos de 2015 e 2016.....	42
Figura 16 - Total de ninfas coletadas nos períodos quentes (verão) e frios (inverno) nos anos de 2015 e 2016.....	42
Figura 17 - Total de adultos coletadas nos períodos quentes (verão) e frios (inverno) nos anos de 2015 e 2016.....	43
Figura 18 - Unidades domiciliares.....	44
Figura 19 - Locais de coletas dos triatomíneos no peridomicílio.....	44
Figura 20 - Ambiente silvestre próximo às unidades domiciliares.....	45
Figura 21 - Coletas no ambiente silvestre onde foi registrado o encontro de triatomíneos nos afloramentos rochosos, durante Janeiro de 2015.....	46
Figura 22 - Coletas em Janeiro de 2015, no ambiente silvestre, encontrando positividade nos afloramentos rochosos.....	47
Figura 23 - Coletas em Julho de 2015, no ambiente silvestre, encontrando positividade nos afloramentos rochosos.....	48
Figura 24 - Coleta de <i>Triatoma infestans</i> no município de Santa Rosa.....	49
Figura 25 - <i>Triatoma infestans</i> coletados no município de Santa Rosa.....	50

Figura 26 - Total de triatomíneos coletados durante o período de 2013 a 2016 nos sete municípios.....	50
Figura 27 - Exemplo de revelação dos resultados da PCR convencional para avaliar infecção natural em triatomíneos. Gel de agarose 2% corado com Nancy.....	52
Figura 28 - Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> de espécimes coletados em municípios do estado do Rio Grande do Sul (análise molecular).....	53
Figura 29 - Número de refeições sanguíneas de acordo com cada estágio ninfal em <i>Triatoma caracavallo</i>.....	58
Figura 30 - Aplicação dos questionários.....	61
Figura 31 - Avaliação do conhecimento da população sobre o inseto barbeiro.....	62
Figura 32 - Avaliação do conhecimento da população sobre onde o inseto barbeiro se localiza no domicílio.....	62
Figura 33 - Avaliação do conhecimento da população sobre onde o inseto barbeiro se localiza fora do domicílio.....	63
Figura 34 - Avaliação do conhecimento da população sobre a fonte alimentar do barbeiro.....	63
Figura 35 - Apresentação dos barbeiros para população durante visita para aplicação do questionário.....	64
Figura 36 - Oficina realizada com os Agentes de Saúde.....	65
Figura 37 - Oficina realizada com os Agentes de Saúde.....	65
Figura 38 - Palestra realizada com os profissionais da Área de Saúde.....	66
Figura 39 - Palestra realizada com os profissionais da Área de Saúde.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências e iniciadores para os ensaios de PCRc e cPCR.....	30
Tabela 2 – Municípios e localidades do Rio Grande do Sul, onde foram coletados Triatomíneos.....	37
Tabela 3 - Total de triatomíneos coletados nos seis municípios do estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2013 e 2014.....	39
Tabela 4 – Total de triatomíneos coletados nos seis municípios do estado do Rio Grande do Sul, no período de junho de 2013 a agosto de 2016.....	41
Tabela 5 - Total de triatomíneos coletados em duas estações do ano.....	43
Tabela 6 - Distribuição dos adultos de triatomíneos por município no estado do Rio Grande do Sul.....	51
Tabela 7 - Identificação da fonte alimentar de acordo com o estágio de desenvolvimento (análise das fezes).....	54
Tabela 8 - Múltiplas fontes alimentares identificadas através do teste de ELISA.....	55
Tabela 9 - Identificação das fontes alimentares dos triatomíneos coletados em 6 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, de acordo com o estágio de desenvolvimento (análise do conteúdo intestinal).....	56
Tabela 10 - Período de incubação dos ovos obtidos de 8 fêmeas de <i>Triatoma carcavallo</i> (em dias).....	57
Tabela 11 - Período de intermuda de <i>Triatoma carcavallo</i> (dias).....	58
Tabela 12 - Resistência ao jejum de <i>Triatoma carcavallo</i> (dias).....	59
Tabela 13 - Mortalidade de <i>Triatoma carcavallo</i>	59
Tabela 14 - Ciclo de desenvolvimento de <i>Triatoma carcavallo</i>	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – Microgramas

µL - Microlitro

BOD – Estufa climatizada com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo

BSM – Plano Brasil Sem Miséria

CENSO - recenseamento demográfico

Ct - ciclo *threshold*

DCA - Doença de Chagas Aguda

DI - Distância inter ocular

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

Dr - Doutor

DTU – Discrete Typing Unit

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou teste de imunoabsorção

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GPS – sistema de posicionamento global

H₂O - água

H₂O₂ – água oxigenada

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano dos municípios

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

KCl – Cloreto de potássio

kDNA – DNA de cinetoplasto

Km – quilômetro

LABIMDOE – Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas

LIVEDIH – Laboratório de Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e
Hemiptera

m – metro

M - molar

MDS – Ministério de Desenvolvimento Social e Agrário

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min - minuto

mL – Mililitros

N1 – ninfa de 1º estágio

N2 - ninfa de 2º estágio

N3 - ninfa de 3º estágio

N4 - ninfa de 4º estágio

N5 - ninfa de 5º estágio

NaCl – Cloreto de Sódio

°C – Grau Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PAHO – Pan American Health Organization

pb – pares de base

PCDCh – Programa de Controle da doença de Chagas

PCR – Reação da Cadeia Polimerase

PCRc – Reação da Cadeia Polimerase Convencional

RNA – Ácido Ribonucleico

RS - Rio Grande do Sul

S – Segundo

TCI – população de *T. cruzi* I

TCII - população de *T. cruzi* II

TCIII - população de *T. cruzi* III

UD – Unidade Domiciliar

UR – Umidade relativa do ar

V – Volts

Z - Zimodema

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Chagas

A trajetória que culminou com a descoberta da doença de Chagas tem início em 1902, quando o estudante da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Carlos Chagas, foi interpelado por Miguel Couto a frequentar o órgão de pesquisa Instituto Soroterápico, criado em 1900 pelo Barão de Pedro Afonso, situado em Manguinhos. Em 1907, Carlos Chagas, após receber a solicitação do médico sanitarista Oswaldo Cruz, seguiu para a Estrada de Ferro Central do Brasil, para um pequeno vilarejo chamado Lassance, localizado ao norte de Minas Gerais, como tentativa de controlar um surto de malária entre operários que atuavam na construção da ferrovia. No ano de 1909, Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas descobriu o primeiro caso humano da doença de Chagas, assim como determinou o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), seu ciclo de transmissão completo, além de identificar o vetor, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), e o primeiro reservatório silvestre, o tatu *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758.

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada sendo endêmica em 21 países das Américas onde cerca de 100 milhões de pessoas estão em risco de infecção, 8 milhões infectadas, 56.000 registros de novos casos anualmente por todos os modos de transmissão, motivando 12.000 mortes anuais (PAHO, 2017). De acordo com o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, mais de 80% das pessoas atingidas por esta enfermidade no mundo não tem acesso a diagnóstico, nem a tratamento sistemáticos ressaltando assim o elevado impacto de morbimortalidade e o custo social desta doença (Dias et al. 2016).

Para conter o avanço desta enfermidade, na década de 1990, países organizados na Iniciativa do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) realizaram diversas medidas de controle vetorial com o objetivo de lograr a interrupção da doença de Chagas, por *Triatoma infestans* (Klug, 1834), tendo também como objetivo a redução e eliminação da transmissão transfusional através do fortalecimento da rede de bancos de sangue (Dias & Schofield 1998). Este trabalho resultou em uma redução de 72% da incidência de infecção humana nas crianças e em jovens nestes países. Em 1997, o Uruguai recebeu o Certificado Internacional de Eliminação da Transmissão Vetorial pelo *T. infestans*. Em 1999, foi a vez do Chile, enquanto em 2006, o Brasil recebeu também o mesmo certificado (Ferreira & Silva 2006), em 2008 no

Paraguai e algumas áreas da Argentina em 2001, 2004, 2011, 2012 (Abad-Franch et al. 2013).

A principal forma de transmissão da doença é a vetorial, sendo esta responsável por 80% a 90% dos casos. A transmissão transfusional é responsável por 8% a 18% dos casos descritos e a transmissão congênita (0,5% a 2%) (Dias & Coura 1997). A transmissão por via oral também tem sido referida por alguns autores, através da ingestão de alimentos contaminados. Surtos de doença de Chagas agudo ocorreram no Brasil, como por exemplo, nos municípios de Catolé do Rocha (Paraíba), Teutônia (Rio Grande do Sul), Riacho de Santana (Bahia), Navegantes (Santa Catarina), Redenção (Ceará), Axixá, (Tocantins), além de relatos na Amazônia por ingestão de alimentos contaminados, principalmente o açaí (Shikanai-Yasuda et al. 1991, Valente et al. 1999, Valente 2005, Nobrega 2009, Ferreira et al. 2014).

De acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil (2015), a casuística da Doença de Chagas Aguda (DCA) passou a ser evidenciada de fato a partir do primeiro surto oficialmente investigado de Chagas aguda por transmissão oral ocorrido em Santa Catarina em 2005, com provável relação à ingestão de caldo de cana contaminada com *T. cruzi*. A partir desse momento, percebeu-se que a forma oral teria importante papel na cadeia de transmissão da doença, com repercussão positiva na sensibilidade da vigilância. Casos isolados, bem como surtos de Doença de Chagas Aguda por transmissão oral, passaram a ser detectados com maior frequência na região Norte do país, contribuindo para o aumento de casos ao longo dos anos.

De acordo com o Ministério da Saúde (2017), a alteração do quadro epidemiológico da doença de Chagas no Brasil promoveu a mudança nas ações e estratégias de vigilância, prevenção e controle, por meio da adoção de um novo modelo de vigilância epidemiológica, de acordo com os padrões de transmissão segundo a área geográfica.

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, Família Tripanosomatidae. É um tripanosomatídeo eurixeno e digenético, uma vez que parte do seu ciclo ocorre em hospedeiro vertebrado e invertebrado (Hoare 1964, 1972, De Souza 2002), representados respectivamente, pelos mamíferos e triatomíneos silvestres, domiciliados ou domésticos. É encontrado parasitando 52 gêneros de mamíferos

(Zingales et al. 2012) e os mais variados tecidos, possibilitando ocupar diferentes nichos como descrito por Deane et al. (1984). Este ecletismo caracterizou-o como um dos parasitos mais bem sucedidos na vida parasitária (Jansen et al. 1999).

T. cruzi apresenta uma grande variabilidade fenotípica e genotípica em suas cepas e desta forma, com o objetivo de estudar esta diversidade, caracterizações de populações deste parasito têm sido realizadas através de técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares tentando associar determinado grupo de parasito a um determinado perfil epidemiológico. A caracterização destes parasitos, procedentes de diferentes hospedeiros, visa contribuir para o esclarecimento do significado biológico e repercussão dessa variabilidade na clínica e na epidemiologia dessa enfermidade (Coura et al. 1966, Miles et al. 2009, Zingales et al. 2012).

A estrutura populacional de *T. cruzi* está distante de ser completamente entendida. Embora a existência de dois grupos seja bem aceita, a existência ou não de um terceiro grupo ancestral tem sido debatida (Pedroso et al. 2003, Brisse et al. 2003, Sturm et al. 2003). Estas populações têm sido agrupadas: (a) em TCI, TCII e TCIII que correspondem ao zimodemas propostos por Miles et al. (1977) com base no polimorfismo observado nos perfis eletroforéticos de seis enzimas onde o zimodema 1 (Z1) e zimodema 3 (Z3) estariam relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e zimodema 2 (Z2) com o ciclo doméstico do parasito; (b) o táxon *T. cruzi* foi subdividido do em seis linhagens ou DTUs, I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, sendo o DTU I correspondente à linhagem *T. cruzi* I e o DTU IIb correspondente à linhagem *T. cruzi* II. As sublinhagens IIa, IIc-e incluem as cepas híbridas e aquelas pertencentes ao zimodema 3 (Brisse et al. 2000); (c) *T. cruzi* é dividido em 2 grupos filogenéticos, TCI e TCII e os demais isolados são considerados resultantes de combinações de subpopulações de TCI e TCII (Tomazi et al. 2009). Mais recentemente, as cepas de *T. cruzi* foram classificadas em seis DTUs (Discret Taxonômica Units), e denominadas de *T. cruzi* I-VI (Zingales et al. 2009).

1.3. Triatomíneos

A transmissão vetorial da doença de Chagas é feita por hemípteros da subfamília Triatominae (família Reduviidae), a través das fezes contendo formas infectantes do parasita, e que são deixadas próximas ao local da picada ou em mucosas, quando o inseto realiza o repasto sangüíneo.

No Brasil, os triatomíneos também podem ser chamados de “barbeiros” e segundo Lent (1999) também são conhecidos como: “chupão”, “chupança”, “fincão”, “furão”, “bicudo”, “percevejão”, “bicho-de-parede”, “bicho-de-parede-preto”, “chupa-pinto”, “percevejo-do-sertão”, “percevejo-francês”, “percevejo gaudério”, “percevejo-grande”, “procotó”, “porocotó”, “baratão”, “bruxa”, “cafote”, “cascudo”, “piolho de pia-çava”, “quiche do sertão”, “rondão” e “vum-vum”, além de “vinchuca” na Argentina, Uruguai e Chile.

O primeiro triatomíneo foi descrito por De Geer, 1773 como *Cimex rubrofasciatus*. Posteriormente, a espécie foi transferida para o gênero *Triatoma* passando a ser chamada *Triatoma rubrofasciata*. O contato dos seres humanos com esses insetos, entretanto, é bastante anterior à descrição de De Geer. O primeiro relato conhecido sobre o aspecto e os hábitos de um triatomíneo é datado de 1590 e foi feito pelo padre Reginaldo de Lizárraga, quando fazia uma viagem de inspeção a conventos do Peru e Chile: “esses insetos que têm medo da luz, mas que tão logo chega à escuridão vem das paredes ou se deixam cair do teto sobre o rosto ou a cabeça dos que dormem”. Darwin em sua célebre viagem pela América do Sul a bordo do “Beagle” também teve a oportunidade de observar esses insetos na Argentina, fazendo o seguinte relato: “Um que eu peguei em Iquique, (eles são encontrados no Chile e Peru) estava muito vazio. Quando colocado em uma mesa e cercado por pessoas, se um dedo fosse apresentado, o inseto corajoso projetava seu aparelho sugador imediatamente e, se permitido, sugava sangue. Nenhuma dor era causada pela ferida. Era curioso observar seu corpo durante o ato de sugar, como em menos de dez minutos mudava de plano de uma bolacha para uma forma globular”. Muitos outros viajantes e naturalistas também fizeram referências a esses insetos, já mencionando sua presença nos domicílios e sua voracidade (Darwin 1871, Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão 2003).

Quando a doença de Chagas foi descoberta, eram conhecidas 33 espécies de barbeiros. Hoje em dia, a subfamília Triatominae Jeannel, 1919 possui 151 espécies atualmente e acredita-se que todas são potenciais vetores da doença de Chagas (Galvão et al. 2003, Justi et al. 2016).

As espécies de triatomíneos apresentam relevante importância epidemiológica devido à necessidade de exercerem o hematofagismo obrigatório em todas as fases da vida sobre os vertebrados, fator determinante de sua proximidade com mamíferos silvestres e/ou homem. Este comportamento favorece a transmissão do *T. cruzi*, (Lent & Wygodzinsky 1979, Schofield & Dolling 1994, Jurberg et al. 2004), tanto pela

transmissão oral quanto pela transmissão vetorial. Embora todas as espécies de triatomíneos sejam vetores em potencial deste protozoário, apenas aquelas que colonizam o domicílio e ou peridomicílio, são epidemiologicamente importantes.

Entretanto, Silveira et al. (2002) mencionaram que as espécies nativas potencialmente vetores, domiciliados ou não, têm merecido atenção especial o que vem gerando estudos sobre os processos de invasão e domiciliação, como consequência da instalação de comunidades humanas que transformam de maneira radical o ambiente (modificação da vegetação por queimadas, desmatamento, estabelecimento de monoculturas) e a invasão dos espaços peridomésticos e das habitações humanas em decorrência da rarefação de seus habitats naturais e de seus hospedeiros. Este impacto no ambiente influencia diretamente a fauna da região, possibilitando assim a transmissão, por insetos vetores, de patógenos ao homem, antes restritos aos animais silvestres.

1.3.1. Triatomíneos do estado do Rio Grande do Sul

Os triatomíneos do Estado brasileiro do Rio Grande do Sul (RS) foram reconhecidos a partir do início do século 20 (Lent 1942). Neiva (1913) fez o primeiro registro de *T. infestans*, e atualmente a fauna triatomínica do estado mostra uma diversidade composta por 12 espécies, incluindo o *T. infestans* (Cardozo-de-Almeida et al. 2013, 2014, Jurberg et al. 2013). Nessa fauna, há o grupo das espécies introduzidas, de hábitos sinantrópicos, habitantes de ninhos de pássaros ou de mamíferos e o grupo das espécies silvestres com habitat rupestre (associadas a rochas), consideradas autóctones. Entre as silvestres, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 e *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) vivem em simpatria e invadem o domicílio humano com frequência (Almeida et al. 2000, Rodrigues et al. 2005).

Triatoma rubrovaria (Blanchard 1843) (Fig. 1) é uma espécie silvestre que invade o domicílio humano devido às mudanças ambientais produzidas por atividades antrópicas aliadas à eliminação de *T. infestans* do domicílio, o que deixa um nicho vazio e disponível (Salvatella et al. 1995, Oscherov et al. 2004).

Neste Estado, Lent (1942) mencionou que *T. rubrovaria* era encontrada exclusivamente em habitats peridomésticos e pedregosos, mas raramente encontrado em habitações humanas. Posteriormente, alguns autores mencionaram o encontro desta espécie em habitats domésticos, mas com nenhuma indicação de colonização nos

intradomicílios (Correa 1968, Lent & Wygodzinsky 1979, Almeida et al. 2000). Silva (1985) e Perlowagora-Szumlewicz et al. (1988) afirmaram a importância de *T. rubrovaria* quanto à veiculação de *T. cruzi* ao homem. Silveira & Rezende (1994) reconheceram a potencialidade desta espécie em colonizar habitações humanas. Salvatella et al. (1994) evidenciaram que esta espécie se alimenta em humanos e Silva & Silva (1993) demonstraram que é um vetor altamente competente de *T. cruzi*. Rosa (1995) destacou o número elevado de exemplares desse triatomíneo em coletas realizadas no Rio Grande do Sul, assim como a presença em residências das áreas rurais próximas ao ecótopo silvestre, o que confirma a importância epidemiológica desta espécie. Esta espécie, gradualmente vem se adaptando ao peridomicílio, colonizando o intradomicílio e transformando-se em um importante vetor secundário (Salvatella et al. 1994).

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), a distribuição geográfica de *T. rubrovaria* no Brasil estava relacionada aos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul, entretanto, de acordo com Rosa (1995) e Rosa et al. (2000), esta distribuição restringe-se à área endêmica da doença de Chagas no Rio Grande do Sul. Já Gurgel-Gonçalves et al. (2012) mencionaram que espécies de *T. rubrovaria* encontram-se restritas ao Bioma Pampa que inclui parte deste Estado. Todavia, Dias et al. (2002) e Meneguetti et al. (2011) destacam um registro isolado de *T. rubrovaria* no município de Ouro Preto do Oeste de Rondônia. Esses triatomíneos alimentam-se de uma variedade de hospedeiros, incluindo o homem, demonstrando rapidez na obtenção do alimento e na primeira defecação, características que indicam esta espécie como um vetor eficaz na transmissão da doença de Chagas (Bar et al. 2003).

Segundo Almeida et al. (2002a), em relação às características biológicas de *T. rubrovaria*, é importante manter a vigilância epidemiológica e realizar estudos em aspectos bionômicos da potencialidade do vetor.



Figura 1 –*Triatoma rubrovaria*.

Triatoma carcavalloei Jurberg, Rocha & Lent, 1998 (Fig. 2) foi descrita com base em quatro fêmeas coletadas no intradomicílio, atraídas pela luz, em diferentes localidades, como Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão e Dom Feliciano, municípios do estado do Rio Grande do Sul. Espécie silvestre, com distribuição geográfica restrita ao Estado do Rio Grande do Sul, vive em simpatria com *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, no peridomicílio e no intradomicílio (Cardozo-de-Almeida 2007).

Esta espécie foi considerada afim de *T. rubrovaria* (Jurberg et al. 1998). Entretanto, distingui-se pelo intenso colorido laranja do lobo posterior do pronoto, do cório e do aspecto aguçado do ângulo anterior do pronoto, além das características morfológicas, do comprimento e da largura da cabeça, do rostro, do tamanho dos olhos, do abdômen e do gonocoxito do nono segmento. Em 2002, esta espécie foi registrada no município de Encruzilhada do Sul, sendo capturado um exemplar em estágio ninfal que atingiu o estágio adulto no laboratório (Almeida et al. 2002b).

Ruas-Neto & Corseuil (2002) observaram em seus estudos a isenção de infecção por *T. cruzi* em *T. carcavallo* e a elevada taxa de infecção por um protozoário gregarínico, *Machadoella triatomae* Reichenow, 1935.

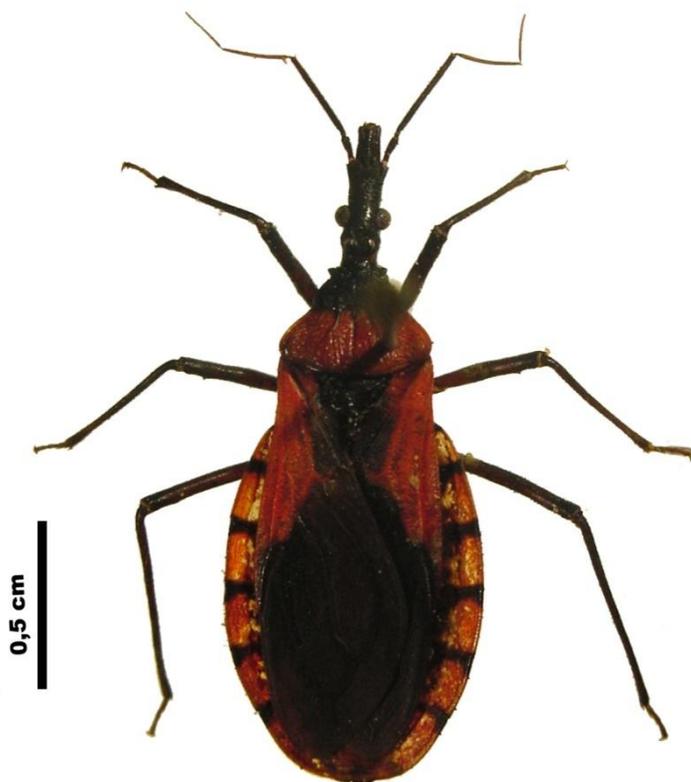


Figura 2 –*Triatoma carcavallo*

No Brasil, *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) (Fig. 3) sua distribuição geográfica está restrita ao Rio Grande do Sul. No Uruguai, é a espécie mais importante depois de *T. infestans*. Na literatura, esta é a segunda espécie silvestre mais capturada no RS e ocupa ecótopos semelhantes a *T. rubrovaria* e por vezes simpátricas (Lent & Wygodzinsky, 1979, Rosa et al. 2000). Ruas-Neto & Corseuil (2002) encontraram *T. circummaculata* em simpatria com *T. carcavallo* e com *T. rubrovaria*.

Estudos filogenéticos com *T. circummaculata* baseados nas seqüências do DNA mitocondrial incluíram-na no complexo *T. infestans* embora estivesse em desacordo com a classificação morfológica (Garcia et al. 2001). Sainz et al. (2004) e Justi et al. (2014) também analisaram seqüências de DNA mitocondrial de *T. circummaculata* e confirmaram a inclusão desta espécie, como um membro do “subcomplexo rubrovaria” dentro do “complexo infestans”.



Figura 3 –*Triatoma circummaculata*

Triatoma infestans (Fig. 4) é considerado um dos principais vetores da doença de Chagas na América Latina, por ser altamente antropofílico, e facilmente infectado por *T. cruzi*. A ampla distribuição de *T. infestans* tem sido associada com a migração humana e espécies mais bem adaptadas ao ambiente intradomicíliar, incluindo fendas nas paredes, telhados, vestuário humano, debaixo das camas e micro-habitats adicionais (Dias 2006). Segundo Hernandez et al. (2013), *T. infestans* é encontrada em habitats domésticos rurais de áreas pobres da América do Sul, onde o vetor é comum, o que representa um alto risco para a transmissão da doença. Outros habitats são freqüentemente infestados pelo *T. infestans* como: galinheiros, currais, gaiolas para coelhos e paióis, que hospedam abundantes populações de vetores a poucos metros de distância das moradias. Os peridomicílios são importantes abrigos destes triatomíneos, criando fontes potenciais de reinfestação e recolonização em domicílios e habitats que foram tratados com inseticidas (Cecere et al. 1997, 2006, Gürtler 1999, Gurevitz et al.

2013). Além disso, estudos têm demonstrado que áreas com concentração de *T. infestans* há infecção humana frequente (Passos & Silveira 2011).



Figura 4 – *Triatoma infestans*

Segundo Silva (1985), o parco conhecimento acerca da biologia, ecologia e morfologia das espécies silvestres não desmerece a importância epidemiológica destas, uma vez que espécies como *T. carvalhoi* e *T. circummaculata* que habitam ambientes rochosos onde a presença das fontes de alimento é intermitente, desenvolvem grande capacidade de resistência ao jejum com acentuado eclestismo alimentar, além de apresentarem irregularidades de intervalos no fechamento do ciclo natural.

No Brasil, os inquéritos entomológicos demonstraram que 17 espécies foram registradas em ambientes domésticos, com graus variados de colonização e de infecção natural (Costa et al. 2003). Uma dessas espécies é *T. rubrovaria*, que passou a ser o triatomíneo mais capturado na região Sul, de acordo com os dados fornecidos pelo

Programa de controle da doença de Chagas (PCDCh) da antiga FNS, hoje FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), do Rio Grande do Sul, entre 1975 e 1997, indicando um crescente processo de invasão domiciliar e peridomiciliar dessa espécie (Almeida et al. 2000, 2005).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2015), entre 2007 e 2011 foram registrados mais de 770.000 triatomíneos capturados em todo território brasileiro por meio da vigilância entomológica passiva ou ativa dos Estados. Dentre as 62 espécies distribuídas entre o intradomicílio e peridomicílio destacam-se as seguintes espécies de importância epidemiológica: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma sordida* e *Triatoma vitticeps*. Destes, foram examinados para identificação da infecção por *T. cruzi* 76,8% dos capturados, resultando numa taxa de infecção natural total de 2,7%. Dos 54,5% exemplares de *T. rubrovaria* examinados, 5,9% estavam infectados naturalmente pelo *T. cruzi*.

Cardozo-de-Almeida et al. (2014) observaram que a capacidade de transmissão em *T. carvalhoi* é tão elevada como em *T. rubrovaria*, enquanto *T. circummaculata* infecta-se com menos frequência muito provavelmente porque se alimenta de mamíferos com menor frequência. Torna-se assim imprescindível dar continuidade aos estudos sobre vetores potenciais na região sul do país de modo a avaliar o risco de reinstalação da doença de Chagas, principalmente entre as populações das áreas rurais, e indicar quais as espécies têm maior capacidade de se adaptarem ao ambiente peri e intradomiciliar.

A principal estratégia de controle da doença de Chagas é a prevenção da transmissão vetorial, a partir da redução e/ou eliminação de triatomíneos domiciliados utilizando inseticidas e vigilância entomológica, com participação comunitária (Dias et al. 2002, Miles 2004, Coura & Vinas 2010). Segundo a PAHO (2017), a situação da transmissão vetorial no Estado do Rio Grande do Sul em Setembro de 2014 diz que a área está interrompida pelo principal vetor (Figura 5).

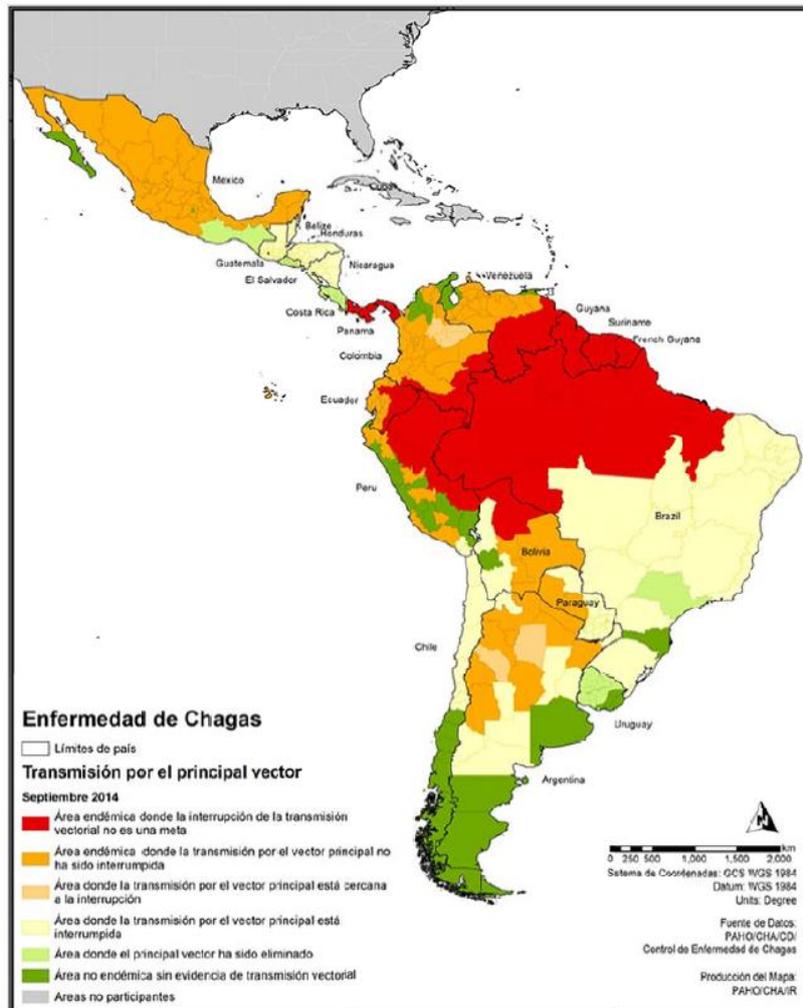


Figura 5 - Mapa da transmissão por *Triatoma infestans* nas Américas (tomado de www.paho.org)

Entretanto, focos de *T. infestans* persistem em 12 municípios do Rio Grande do Sul: Ajuricaba, Alegria, Coronel Barros, Doutor Maurício Cardoso, Giruá, Humaitá, Ijuí, Independência, Porto Mauá, Salvador das Missões, Santo Cristo e São José do Inhacorá (Dias et al. 2016).

Em 2014, uma equipe do Centro Estadual de Vigilância em Saúde da Secretaria Estadual de Saúde, encontrou um foco no município de Santa Rosa (RS).

1.4. O Plano Brasil Sem Miséria

O Plano Brasil sem Miséria (BSM) foi criado em junho de 2011 para superar a extrema pobreza no país, sempre tendo em vista que a pobreza não se resume a uma questão de renda. A extrema pobreza se manifesta de múltiplas formas sendo a insegurança alimentar e nutricional, baixa escolaridade, pouca qualificação profissional, fragilidade de inserção no mundo do trabalho, acesso precário à água, energia elétrica, saúde e moradia algumas dessas formas. Superar a extrema pobreza requer, portanto, a ação articulada desses e de outros setores (Brasil 2014).

Sob a Coordenação do Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS), o BSM foi lançado por meio do Decreto nº7.492, em 02 de junho de 2011 e a estratégia de superação da extrema pobreza teve como base informações sobre a população brasileira observando três referenciais, quais sejam: (i) o Censo 2010, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); (ii) os dados do Cadastro Único para os Programas Sociais do MDS; (iii) e as ações setoriais apresentadas pelo conjunto dos Ministérios.

A ferramenta que permite ao Brasil Sem Miséria chegar ao seu público-alvo em todo o país é o Cadastro Único dos Programas Sociais do Governo Federal. Nele estão registradas informações sobre as famílias mais pobres do Brasil, permitindo ao poder público incluí-las em iniciativas municipais, estaduais e federais. Atualmente, 14,1 milhões de famílias, quase 50 milhões de pessoas, são atendidas pelo Programa Bolsa Família.

O Brasil Sem Miséria estabeleceu como extremamente pobre, as pessoas com renda inferior a R\$ 70, o equivalente ao poder de compra de US\$ 1,25 diário por pessoa em cada país, seguindo parâmetro internacional. Esse valor foi reajustado em junho para R\$ 77,00 (Brasil 2014).

De acordo com os registros em fevereiro de 2016 do Cadastro Único e com a folha de pagamento de abril de 2016 do Programa Bolsa Família do Plano BSM no Rio Grande do Sul, o estado tem 1.043.472 famílias registradas no Cadastro Único e 405.128 famílias beneficiárias do Programa Bolsa Família (11,91% da população do estado). O valor total de repasses às famílias inscritas neste programa teve um aumento de 60,00% no estado entre 2010 e 2015, comparado à média nacional de 71,9% de crescimento.

No Rio Grande do Sul, 90,80% das crianças e jovens de 6 a 17 anos inscritas no Programa Bolsa Família têm registro de acompanhamento de frequência escolar. Na

área da saúde, o acompanhamento chega a 67,68% das famílias com perfil, ou seja, aquelas com crianças de até 7 anos e/ou com gestantes.

Com a criação do Plano Brasil sem Miséria pelo governo federal, com o objetivo de romper barreiras sociais, políticas, econômicas e culturais que segregam pessoas e regiões, e dentro da perspectiva deste plano, o Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, através da Nota Técnica N.º 1/2011/IOC-FIOCRUZ/Diretoria recomenda: “Ciente dos esforços do Ministério do Desenvolvimento Social para elaborar um Programa de Erradicação da Pobreza Extrema, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), enquanto instituição pública dedicada à pesquisa científica, comprometida com a saúde pública nacional e reconhecida como Referência Nacional para o Ministério da Saúde (Portaria nº 75 da Secretaria de Vigilância em Saúde, de 29 de agosto de 2008), cumpre com seu dever e vem, nesta Nota Técnica, recomendar que o tema das “doenças da pobreza” seja contemplado na elaboração deste documento e que a educação popular seja inserida nas ações do Programa, objetivando contribuir para prevenir e controlar estas doenças e promover a saúde da população a quem se dirigem tais ações (www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica_IOC).

1.4.1 - A doença de Chagas no contexto do BSM

As doenças negligenciadas são um grupo de doenças tropicais que afetam principalmente populações da Ásia, África e América Latina (Hotez 2014). São consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) como “doenças infecciosas relacionadas à pobreza” ou “doenças infecciosas da pobreza”, entre as quais se incluem a dengue, a doença de Chagas, a febre reumática, a esquistossomose, as leishmanioses, a leptospirose, a malária e algumas parasitoses intestinais.

Segundo a Nota Técnica do Instituto Oswaldo Cruz (2011), a doença de Chagas possui uma estimativa, sem inquérito dirigido de três milhões de portadores crônicos, com transmissão vetorial principal interrompida e com cerca de 250 casos agudos por ano por transmissão oral. O contingente de indivíduos crônicos se dirige à atenção básica no programa de Saúde da Família, onde se registra: maioria de mulheres, predominância entre 45 e 75 anos, 50% analfabetos e 26,4% analfabetos funcionais, 40% aposentados, 37% indigentes ou pobres, 46% referindo que a doença acarreta

limitações em sua vida e 75% relatando nunca terem recebido informações a respeito da doença de Chagas por parte dos profissionais de saúde.

A proposta inclui estudos para o controle das chamadas “doenças da pobreza”, como a doença de Chagas, em busca de maior igualdade e justiça social associadas a ações educativas junto às populações beneficiadas pelo Plano Brasil sem Miséria do governo federal. Desta forma, chama-se a atenção, para a extrema necessidade de continuidade das pesquisas científicas aliadas, entretanto à educação como ferramenta para enfrentar esta enfermidade pela capacitação dos profissionais de atenção básica, de agentes de saúde, professores e população nas diversas áreas cobertas pelo programa, nas quais estão incluídos os municípios do estado do Rio Grande do Sul, inseridos nesta tese.

1.5. Educação em saúde como suporte às ações do BSM

A Educação em Saúde é o campo de prática e conhecimento do setor Saúde que tem se ocupado mais diretamente com a criação de vínculos entre a ação médica e o pensar e fazer cotidiano da população. Atuando a partir de problemas de saúde específicos ou de questões ligadas ao funcionamento global dos serviços, busca-se entender, sistematizar e difundir a lógica, o conhecimento e os princípios que regem a subjetividade dos vários atores envolvidos, de forma a superar incompreensões e mal entendidos ou tornar conscientes e explícitos os conflitos de interesse. Dedicase à ampliação dos canais de interação cultural e negociações (cartilhas, jornais, assembleias, reuniões, cursos, visitas etc.) entre os diversos grupos populares e os diversos tipos de profissionais e instituições. A Educação Popular não é o único projeto pedagógico a valorizar a diversidade e heterogeneidade dos grupos sociais, a intercomunicação entre diferentes atores, o compromisso com as classes subalternas, as iniciativas dos educandos e o diálogo entre o saber popular e o saber científico (Valla 1999).

Os processos de ensino-aprendizagem podem ser interpretados como um conjunto de atividades realizadas coletiva e socialmente a partir de conceitos, experiências e sentimentos que os sujeitos da aprendizagem já possuem (Freire 1983, 1996, Marin et al. 1997). Neste processo, incorporam-se, através de processos de reflexão-ação, a assimilação ativa de novas interpretações e concepções mais complexas

e aprofundadas das inter-relações sócio-ambientais, mediadas cultural e historicamente pelas situações concretas nas quais se encontram inseridas.

Classicamente, os estudos epidemiológicos têm procurado explicar as desigualdades na saúde da população segundo fatores sociais e econômicos tais como renda, ocupação, educação, habitação, ambiente ou, de maneira geral, as assim denominadas condições de vida. Consensualmente, estes estudos mostram que a saúde da população apresenta forte gradiente social que está fortemente ligado à educação e a eficiência dos respectivos sistemas de saúde.

Para o controle de endemias, a saúde pública conta com ações de diversas naturezas, que visam ao impacto direto nas relações causais, e com campanhas informativas para a instrução da população quanto aos cuidados e prevenção de pragas, para em consequência evitar o desencadear das possíveis doenças (Lenzi et al. 2000).

Um dos principais elementos para se controlar a doença de Chagas é a educação das populações que vivem em áreas afetadas ou sob risco. Nesse sentido, o papel do agente de saúde bem capacitado é fundamental para o sucesso das campanhas. Embora exista um grande volume de informações a respeito dos vetores e do parasito, são raras as obras destinadas ao treinamento dos agentes de saúde (Argolo et al. 2008).

Diante da realidade apresentada por alguns municípios do estado do Rio Grande do Sul, ficou clara a necessidade de um trabalho de informação mais amplo que possa auxiliar o trabalho de vigilância entomológica. Para isso, é fundamental que a população esteja sempre informada sobre o inseto vetor e a doença de Chagas, para que tomem as medidas necessárias garantindo uma melhor condição de vida. De acordo com Valla (1999), a Educação em Saúde é um campo de prática e conhecimento que tem se ocupado mais diretamente com a criação de vínculos entre a “ação médica” e o “pensar e fazer cotidiano” da população. Assim, a implementação de políticas educativas relacionadas à sensibilização e capacitação em temáticas prioritárias de saúde pública constitui-se em um importante instrumento para progresso social e econômico do país. Neste aspecto, essa tese permitiu ações de interação direta com a população, professores da rede pública e profissionais de saúde através da educação em saúde estando assim alinhado às metas do Plano Brasil sem Miséria (BSM).

1.6. Justificativa

Embora o Brasil mantenha constante a operação de vigilância, controle e combate dos principais vetores da doença de Chagas, o risco de transmissão da doença persiste decorrente de fatores como: baixas condições de vida da população, presença de triatomíneos no peri e intradomicílio, dentre outros. Em vários municípios da região Sul é constante os relatos destes insetos invadindo e/ou colonizando as unidades domiciliares (UD). Existe uma preocupação atual com espécies secundárias na transmissão da doença de Chagas, dado que tais espécies, em algumas regiões, já iniciaram um ciclo peridomiciliar e domiciliar. Tal observação mostra a surpreendente capacidade que os triatomíneos têm de se adaptar a novas situações ecológicas.

Os municípios de Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Canguçu e Encruzilhada do Sul pertencem ao quadro de maior prevalência da doença de Chagas no estado do Rio Grande do Sul por transmissão vetorial, sendo de 16 a 45 casos confirmados, segundo Lannes-Vieira et al. (2009). Os domicílios destes municípios estudados fazem parte das famílias alvo do Plano BSM, e mesmo recebendo os benefícios do Programa Bolsa Família, 510 famílias continuam em situação de pobreza extrema.

A relevância deste estudo está ainda na possível correlação da dinâmica deste vetor com parasito, ampliando-se o conhecimento sobre as cepas de *T. cruzi* que circulam na natureza, entre os habitats silvestres, peridomiciliar e domiciliar, associada aos hospedeiros invertebrados, contribuindo, desta forma, para uma melhor compreensão epidemiológica das áreas estudadas. Tendo isto em vista, nosso objetivo é realizar um estudo biológico e molecular dos isolados de *T. cruzi*, provenientes de triatomíneos silvestres dessa região.

Existem poucas informações acerca dos níveis de infecção natural de triatomíneos coletados no Brasil. Nesse sentido, nosso principal objetivo é aplicar o ensaio de *PCR multiplex* empregando iniciadores que permitam detectar ao mesmo tempo o kDNA de *T. cruzi* e uma seqüência genômica consenso exclusiva de diversas espécies de triatomíneos, no diagnóstico molecular de insetos vetores naturalmente infectados com *T. cruzi*. Assim, com intuito de contribuir para a compreensão do papel do vetor na ocorrência da doença em áreas endêmicas, estamos aplicando a tecnologia de PCR em tempo real para detectar a medida da carga parasitária nos insetos coletados nas áreas estudadas. O sistema de PCR em tempo real fornece dados quantitativos precisos sem necessidade de análise posterior dos produtos amplificados, evitando desta forma os riscos de contaminação laboratorial pelos *amplicons*, um dos problemas

inerentes à tecnologia de PCR. Esta abordagem molecular contribuirá para melhor compreensão da epidemiologia da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, além do estudo com uso de outras ferramentas como a morfometria clássica, contribuindo assim, para o maior entendimento da epidemiologia da doença nessa região, o que contribui para a elaboração de planos estratégicos para controles cada vez mais eficazes desta doença.

Uma das formas de prevenção da doença de Chagas é evitar que os triatomíneos colonizem as residências. Em nosso trabalho, incorporamos ações educativas, pois ficou clara a necessidade de um trabalho de informação mais amplo visando contribuir para o fortalecimento do trabalho de vigilância entomológica em áreas onde há a incidência destes insetos. Ressalta-se ainda a necessidade de esclarecer quanto aos outros mecanismos de transmissão, particularmente a via oral, e os cuidados a serem tomados por profissionais que trabalham com animais silvestres, evitando a contaminação acidental, sendo estes objetos de vigilância permanente. Desta forma, é importante que seja dada atenção para a extrema necessidade de continuidade das pesquisas científicas aliadas, entretanto à educação como ferramenta para enfrentar esta enfermidade através da capacitação dos profissionais de atenção básica, de agentes de saúde, professores e população principalmente em áreas de extrema pobreza, onde as condições e serviços básicos são precários. Neste sentido, damos continuidade à atuação do grupo de trabalho, que vêm atuando em vários municípios brasileiros, com o projeto educativo “Olho Vivo no Barbeiro” liderado por Teresa Cristina Monte Gonçalves, do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera pertencente ao Instituto Oswaldo Cruz. O projeto se focaliza em ações de divulgação em escolas públicas e privadas e através de cursos de Capacitação (Agentes de Saúde, Agentes Comunitários, Laboratoristas e docentes) além de programas de sensibilização de alunos e membros da comunidade, utilizando como ferramentas metodológicas apostilas, *folders* e outros materiais educativos com conteúdos diferenciados para atender aos diferentes segmentos alvo (profissionais, professores, alunos e comunidade). Considera-se que educação é uma importante ferramenta para garantia de sucesso em programas de prevenção e erradicação de doenças, pois representam instrumentos para a manutenção de políticas institucionais de controle, como preconizado pelo Consenso de Chagas (Ministério da Saúde, 2005). Neste contexto, em consonância com objetivos institucionais que se alinham aos desafios do Plano Brasil sem Miséria (BSM) foram realizadas as ações de vigilância entomológica e epidemiológica aliadas a ações de

ensino e divulgação em ciência e cultura fortalecendo a promoção da saúde em municípios cadastrados neste plano no estado do Rio Grande do Sul.

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar um estudo multidisciplinar com abordagem biológica, morfométrica e molecular em triatomíneos do Estado do Rio Grande do Sul, assim como, implementar ações educativas para sensibilizar e informar a população e capacitar profissionais de saúde como forma de contribuir para a prevenção da doença de Chagas no Estado, em consonância com as ações previstas no Programa Brasil sem Miséria (BSM).

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a distribuição de triatomíneos nos ambientes silvestres, peri e intra-domicílio nos municípios de Caçapava do Sul, Cachoeira do Sul, Canguçu, Encruzilhada do Sul, Lavras do Sul, São Jerônimo e Santa Rosa.
- Determinar o índice de infecção natural por *Trypanosoma cruzi* nos triatomíneos capturados nos ambientes silvestres, peri e intra-domicílio.
- Determinar a fonte alimentar desses triatomíneos, com o intuito de conhecer os possíveis hospedeiros e/ou reservatórios associados.
- Avaliar aspectos da biologia de *Triatoma caracavallo*.
- Informar e sensibilizar os profissionais de saúde e a população quanto à importância da vigilância entomológica e sobre a doença de Chagas, visando o bem estar e a saúde das comunidades dos municípios envolvidos.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes analisados neste estudo foram procedentes de sete municípios do Estado do Rio Grande do Sul, sendo realizado em seis deles (Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Canguçu, Lavras do Sul e São Jerônimo) um estudo de campo com coletas realizadas pela equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera -LIVEDH em conjunto com a colaboração de Agentes de saúde dos municípios ligados a Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Rio Grande do Sul. Em um município (Santa Rosa) as coletas foram feitas exclusivamente pela equipe de agentes de endemia do estado do Rio Grande do Sul, durante a avaliação de um foco de triatomíneos como objetivo do Plano Nacional de Controle da Doença de Chagas (PNCDCCh).

3.1. Caracterização das áreas de estudo

3.1.1. Estudo de campo

3.1.1.1. Cachoeira do Sul (Fig. 6 a):

Município localizado na depressão central do Rio Grande do Sul, na região conhecida como Vale do Jacuí, estando a 26m de altitude, possuindo vegetação do tipo pampa. Apresenta uma população total do município de 83. 827 de habitantes, segundo CENSO (2010), e uma área de 3.735,167 km². O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,719 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Municipal é de 0,788, segundo o IBGE (2000). Segundo o Perfil Cadastro Único (CENSO 2010) a estimativa de famílias de baixa renda é de 8.968. Já o Perfil Bolsa Família estabelece uma estimativa de 4.154 famílias pobres - com uma cobertura do 91,82% (<http://www.brasilsemisericia.gov.br>).

3.1.1.2. Caçapava do Sul (Fig. 6 b):

Município localizado a 444m de altitude com uma área de 3.047,120 km². Juntamente com Encruzilhada do Sul e Canguçu faz parte da Serra do Sudeste, que na verdade são formações do tipo planalto, com ondulações suaves e moderadas. A vegetação é rasteira e herbácea (pampas). A população total do município é de 33. 700 de habitantes CENSO (2010). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,678 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Municipal é de 0,768,

segundo o IBGE (2000). Na estimativa feita sobre as famílias de baixa renda o Perfil Cadastro Único (CENSO 2010) aponta 4.632, estando no Perfil Bolsa Família 2.162/ Cobertura: 98,18%. (<http://www.brasilsemiseria.gov.br>).

3.1.1.3. Canguçu (Fig. 6):

Município situado a 386m de altitude e como citado faz parte da Serra do Sudeste, apresentando também vegetação do tipo pampa. A população total do município é de 53.268 de habitantes, segundo CENSO (2010), ocupando uma área de 3.525,068 [km²](#). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,638 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) - Municipal é de 0,743, segundo o IBGE (2000).– Dados do Perfil Cadastro Único (CENSO 2010) mostra a estimativa 7.515de famílias de baixa renda, e dentre estas 3.248 no Perfil Bolsa Família, com Cobertura de 72,11% (<http://www.brasilsemiseria.gov.br>).

3.1.1.4. Encruzilhada do Sul (Fig. 6):

Município com uma área de 3.438,503 [km²](#), estando a 432m de altitude, fazendo parte da chamada Serra do Sudeste, com população total do município de 24.537 de habitantes, segundo CENSO (2010). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,672 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) - Municipal é de 0,760, segundo o IBGE (2000). Na estimativa de famílias de baixa renda – Perfil Cadastro Único (CENSO 2010) encontram-se 4.327 enquanto que na estimativa de famílias pobres - Perfil Bolsa Família vê-se 1.807/ Cobertura: 75,58% (<http://www.brasilsemiseria.gov.br>).

3.1.1.5. Lavras do Sul (Fig. 6):

Pertencente à meso-região do sudoeste do estado localiza-se a uma altitude de 450m apresentando vegetação variada ao longo de seu território, desde campos mistos com arbustos, até campos limpos e planície, com população total do município de 7.679 de habitantes, segundo CENSO (2010), e área de 2.600,600 [km²](#). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,683 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) - Municipal é de 0,699, segundo o IBGE (2000). Apresenta uma estimativa de 1.108 famílias de baixa renda – Perfil Cadastro Único (CENSO 2010),

418 atendidas no Perfil Bolsa Família, com cobertura de 68,52% da população. (<http://www.brasilsemmiseria.gov.br>).

3.1.1.6. São Jerônimo (Fig. 6 f):

Município localizado na área metropolitana de Porto Alegre, situando-se a 29m de altitude. Está localizado em uma planície com vegetação de matas, florestas e campos apresentando uma população total de 72.240 de habitantes, segundo CENSO (2010), e área de 489,798 km². O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,734 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) - Municipal é de 0,696, segundo o IBGE (2000). A estimativa de famílias de baixa renda – Perfil Cadastro Único (CENSO 2010) é 2.621, e a estimativa de famílias pobres incluídas no Perfil Bolsa Família é de 1.296/ Cobertura: 93,98% (<http://www.brasilsemmiseria.gov.br>).

3.1.2. Averiguação de foco de triatomíneos

3.1.2.1. Santa Rosa (Fig. 7):

Município localizado a 277m de altitude, na fronteira noroeste do estado, faz parte do Planalto Meridional. No passado era coberto por florestas subtropicais que foram praticamente substituídas com a introdução do binômio trigo-soja na região. Com população total do município de 72.240 de habitantes, segundo CENSO (2010), ocupa uma área de 489,798 km². O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) – Renda é de 0,752 e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) - Municipal é de 0,769, segundo o IBGE (2000). Apresenta 4.338 na estimativa de famílias de baixa renda – Perfil Cadastro Único (CENSO 2010), e estimativa de famílias pobres - Perfil Bolsa Família: 2.283/ Cobertura: 89,01% (<http://www.brasilsemmiseria.gov.br>).

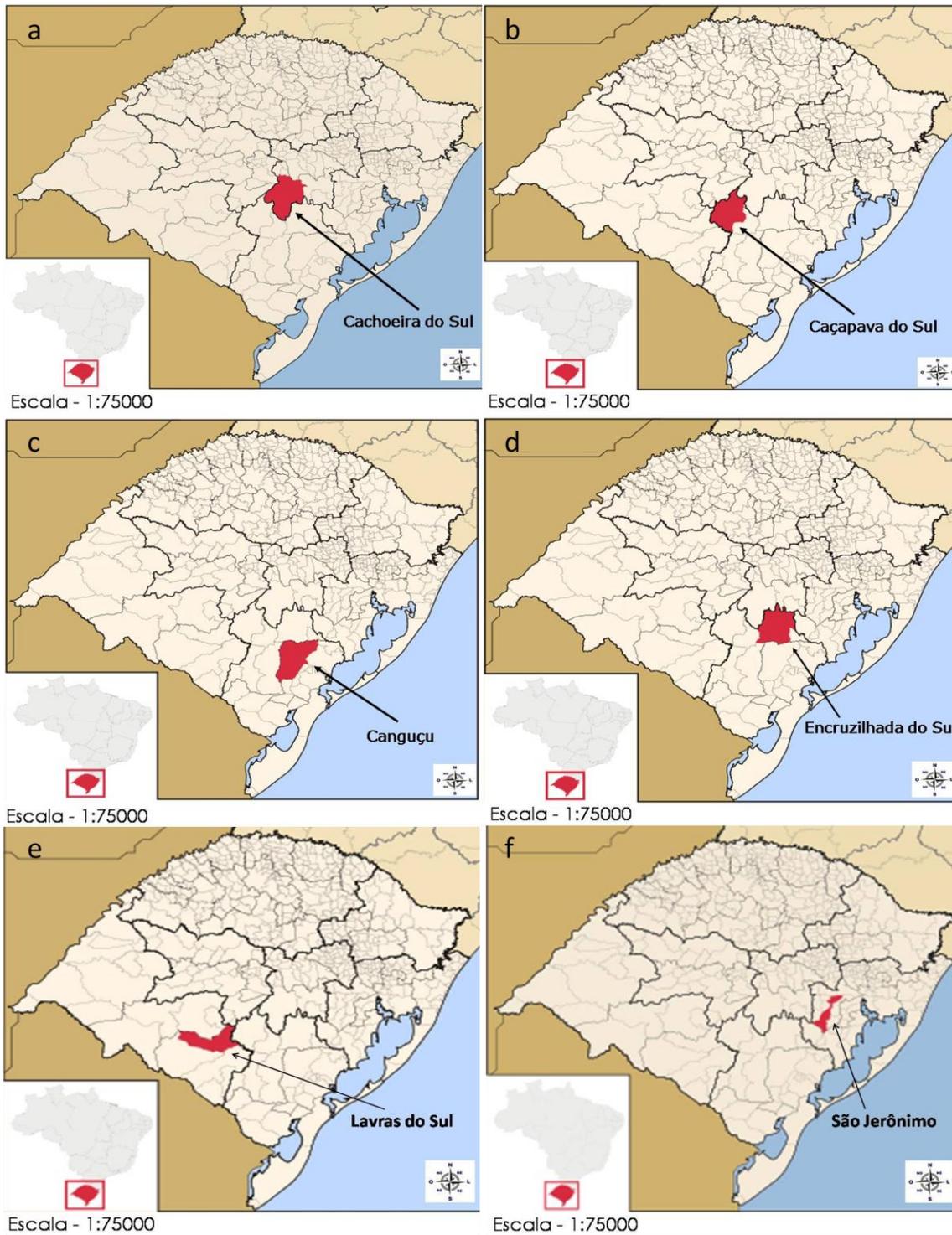


Figura 6 - Mapas do Estado do Rio Grande do Sul, destacando-se os municípios de Cachoeira do Sul (a), Caçapava do Sul (b), Canguçu (c), Encruzilhada do Sul (d), Lavras do Sul (e) e São Jerônimo (f), onde foi realizado o Estudo de campo.



Figura 7- Mapa do Estado do Rio Grande do Sul, onde destaca-se o município de Santa Rosa, local de averiguação do foco de triatomíneos.

3.1.3. Coleta dos triatomíneos

Durante os anos 2013-2016, as coletas foram realizadas pela equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera - LIVEDH em conjunto com a colaboração de Agentes de saúde dos municípios ligados a Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Rio Grande do Sul, com pronta intervenção de controle em caso de infestação peridomiciliar ou domiciliar, com exceção do município de Santa Rosa, onde os exemplares foram coletados apenas pelos técnicos da Vigilância.

No ambiente intradomiciliar e peridomiciliar, os insetos foram procurados pelo método de busca ativa nas habitações humanas, onde haja indícios da presença do triatomíneo e nas estruturas peridomésticas, tais como: galinheiros, pocilgas, amontoados de telhas e tijolos, de pedras, cercas e etc.

No ambiente silvestre, a captura dos triatomíneos foi realizada na periferia imediata (50m, 100m, 150m) dos espaços habitacionais e em áreas naturais (pouco antropizadas) pelos métodos de pesquisa direta de nichos geralmente ocupados pelos triatomíneos como buracos nas árvores, rochas ou pilhas de pedras, ninhos de aves e abrigos terrestres de animais através de busca direta.

3.1.4. Identificação dos insetos

Os insetos coletados foram levados para o LIVEDIH em frascos devidamente identificados (Fig. 8) e georreferenciados (GPS Garmin), sendo posteriormente identificados através de chave dicotômica preconizada por Lent & Wygodzinsky (1979). Parte do material coletado foi destinada a formação de colônias que encontram-se no Laboratório e a outra foi analisada através de diversas técnicas (morfometria clássica, identificação de fonte alimentar, PCR em Tempo Real).



Figura 8 - Frascos contendo os insetos identificados

3.1.5. Manutenção dos insetos na colônia

Os triatomíneos estão sendo mantidos no insetário do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera - LIVEDIH, do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (Fig. 9). As criações permanecem em frascos de vidro cobertos com nylon, contendo internamente papel de filtro sanfonado com o objetivo de aumentar a superfície de contato e a possibilidade de refúgio, bem como retirar também o excesso de umidade. Semanalmente as colônias são alimentadas em sangue de camundongo suíço (Protocolo CEUA - FIOCRUZ LW-14/10) até a repleção dos insetos.



Figura 9 - Manutenção dos insetos na colônia

3.1.6. Identificação da presença de infecção por tripanosomas utilizando Microscopia ótica

Para detectar *T. cruzi* pelo método convencional em triatomíneos vivos, as fezes foram obtidas por compressão abdominal com o auxílio de pinça, sendo a seguir diluídas em solução salina (NaCl a 0,85%) e observadas entre lâmina e lamínula por microscopia ótica (aumento de 400 vezes). Para os insetos mortos, o intestino médio posterior e o intestino posterior foram dissecados e colocados em placas de Petri estéreis contendo 2 ml de solução fisiológica e 100 µg/mL 5- fluorocitosina. O homogenato

também foi observado entre lâmina e lamínula para a visualização do parasito por microscopia óptica (aumento de 400 vezes) (Fig. 10).

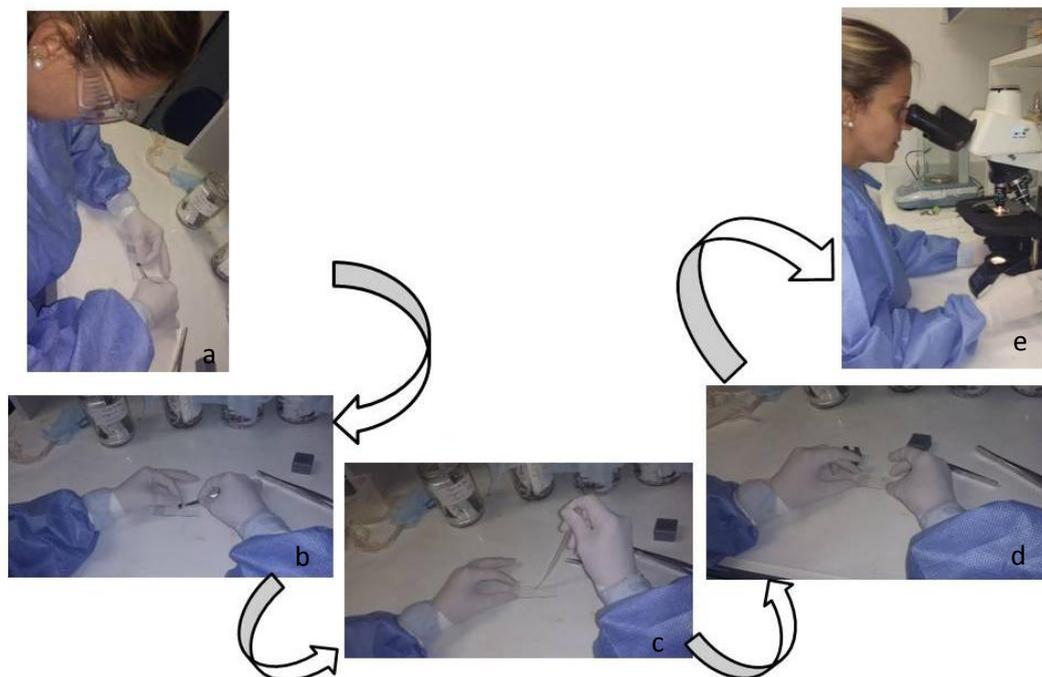


Figura 10 – Sequência demonstrativa (a-e) do exame parasitológico das fezes dos triatomíneos.

3.1.7. Avaliação das taxas de infecção natural e da carga parasitária de *T. cruzi* em triatomíneos de campo por PCR

As análises desta etapa foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE). Todos os procedimentos realizados obedeceram às Boas Práticas de Laboratório para evitar contaminações nas realizações das técnicas, tanto pela divisão física das etapas de extração de DNA e PCRs (pré-reação e pós-reação), quanto pela descontaminação prévia de todos os materiais e capelas/fluxos laminares utilizados com o uso de hipoclorito de sódio a 2% ou DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions (AMBION, Austin, TX), no caso dos equipamentos. Todas as ferramentas utilizadas na dissecação do inseto eram descartáveis e submetidas aos mesmos processos. Para monitorar eventual contaminação, foram utilizados controles negativos para a etapa de extração de DNA (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC) e PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril).

3.1.7.1. Extração de DNA

Após o exame parasitológico por microscopia óptica, o intestino médio posterior e o intestino posterior de cada triatomíneo foram dissecados (Fig. 10) e transferidos para tubo eppendorf de 1,5mL contendo 200µL da mistura de 970µL de tampão de lise 1X (Tris-HCl a 1 mM, EDTA a 1 mM, pH 9,2) e 30µL de Proteinase K (150 µg/mL, SIGMA-Aldrich®, São Paulo, Brasil). As preparações foram incubadas (2 horas, 56°C), com agitações constantes, e o DNA foi extraído em colunas de sílica, utilizando o kit de extração QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), seguindo o protocolo do fabricante com modificações na etapa final de eluição do DNA (eluído em 100µL). O DNA eluído foi armazenado a -20°C para os posteriores ensaios de PCR convencional (qualitativo) e qPCR.

3.1.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCRc)

Para a amplificação bioquímica de sequências específicas foram utilizados os iniciadores 121 e 122 para os minicírculos do kDNA de *T. cruzi* (Tabela 1), descritos por Sturm et al. (1989) e modificados por Wincker et al. (1994), que hibridizam com as sequências flanqueadoras das regiões conservadas das moléculas de minicírculos, amplificando produtos de 330 pb, correspondentes às regiões hipervariáveis (Avila et al. 1991, Britto et al. 1993, Wincker et al. 1994). No mesmo ensaio, em formato duplex, foram introduzidos os iniciadores P2B e P6R (Tabela 1), desenhados previamente pelo nosso grupo (Uehara et al. 2012), com alvo no gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal, que amplificam uma sequência genômica conservada de 163 pb em espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. As reações ocorreram em um volume final de 50µL contendo 5µL de DNA, 5µL de solução tampão 10X [100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 9µL MgCl₂ (4,5 mM), 0,4µL Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/µL) (Life Technologies, USA), 2µL dNTPs (0,4 mM, Life Technologies, USA), 1µL de cada iniciador 121 e 122 (200 nM) e 0,5µL de cada iniciador P2B e P6R (100 nM) e 19,6µL de H₂O ultra-pura. A ciclagem térmica foi realizada no aparelho modelo GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, USA), com a seguinte programação: Hot Start (12 min, 94°C), seguido por 36 ciclos de desnaturação (30s, 94°C), anelamento (30s, 55°C), extensão (30s, 72°C) e extensão final (10 min, 72°C).

Em todas as reações foram incluídos os controles positivos: DNAs de *T. rangeli* (Cepa Macias), de *T. cruzi* (Cepa CI-Brener) e amostra reconstituída experimentalmente

(Controle positivo de infecção: DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* Cl-Brener), sendo este último necessário para confirmar a eficiência da reação em *multiplex*. Também foram incluídos os controles negativos da reação de PCR (todos os reagentes sem o DNA) e da etapa de extração de DNA (DNA de *R. prolixus* livre de infecção mantido em laboratório e um tubo contendo apenas água ultra-pura).

3.1.7.3. Eletroforese em gel de agarose

Após a PCRc, 12 μ L dos produtos amplificados foram misturados com 2,4 μ L do tampão de amostra 1X (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30% de glicerol), e aplicados em gel de agarose a 2% imerso em tampão TBE 1X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH=8) corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain* (SIGMA-Aldrich®, São Paulo, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada por cerca de 20 min a 80V (até todo o conteúdo amostral sair do poço de aplicação), seguida de 40min a 1 hora em 110V. O peso molecular dos produtos de PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder - Invitrogen, California, USA) incluído nos géis.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação em luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

3.1.7.4. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

Para estimar a carga parasitária de triatomíneos que se mostraram positivos para *T. cruzi* pela PCRc, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema TaqMan de qPCR. Assim como na PCR convencional, os ensaios TaqMan foram realizados em *multiplex*, contendo na mesma reação, os iniciadores para o gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (iniciadores P2B e P6R) e sonda Taqman para triatomíneos (Triat) desenhada pelo LABIMDOE (manuscrito em preparação), e para o alvo DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (iniciadores Cruzei1 e Cruzei2), desenhados para amplificar uma região de 166pb e a sonda Cruzei3 (Piron et al. 2007) (Tabela 1). As reações ocorreram em um volume final de 20 μ L contendo 2 μ L DNA, 10 μ L TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 1,2 μ L de cada iniciador Cruzei1 e Cruzei2 (600 nM) e 1 μ L sonda Cruzei 3 (FAM/NFQ-MGB) (250 nM), 0,6 μ L iniciador P2B (300 nM), 1 μ L iniciador P6R (500 nM) e 0,3 μ L sonda Triat (VIC/NFQ-MGB - Applied Biosystems) (150 nM) e 2,7 μ L H₂O ultra-pura. Os ensaios foram realizados no equipamento ABI Prism 7500 Fast (*Sequence Detector System* –

Applied Biosystems), albergado pela plataforma PDTIS RPT-09A, com a seguinte programação: atividade inicial da enzima amperase (1 min, 50°C), desnaturação inicial/ativação Taq Polimerase Hot start (10 min, 95°C), 40 ciclos de desnaturação (15s, 95°C) e anelamento/extensão (1 min, 58°C).

Tabela 1 – Sequências e iniciadores para os ensaios de PCRC e cPCR.

Alvos	Iniciadores/Sondas	Produtos amplificados (pb)	Sequência (5' – 3')
kDNA de <i>T. cruzi</i>	121 (Forward) 122 (Reverse)	330	AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA
DNA Satélite de <i>T. cruzi</i>	Cruzi 1 (Forward) Cruzi 2 (Reverse) Cruzi 3 (Sonda)	166	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA FAM-TTGGTGTCCAGTGTGTG-NFQ-MGB
12S RNAr de triatomíneo	P2B (Forward) P6R --(Reverse) *Triat (Sonda)	163	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT GCTGCACCTTGACCTGACATT VIC-TCAGAGGAATCTGCCCTGTA-NFQ-MGB

*Manuscrito em preparação

3.1.7.5. Curva padrão

As curvas padrão de calibração para os alvos *T. cruzi* e triatomíneo, foram construídas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de um *pool* de cinco intestinos de triatomíneos não infectados (*R. prolixus*, ninfas de 5º estágio) previamente contaminado com formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener), variando de 105 a 0,5 equivalentes de parasito/*pool* de triatomíneo. O DNA das amostras reconstituídas foi recuperado. Para as diluições seriadas das amostras reconstituídas, extrato de intestino de triatomíneo não infectado foi usado como diluente, a fim de se evitar variações nos valores de ciclo *threshold* (Ct) para o alvo triatomíneo, usado como controle interno para verificar a qualidade do DNA extraído e a possível presença de inibidores da PCR nas amostras.

Cada diluição foi correspondente a um ponto que compôs a curva padrão para quantificação absoluta de *T. cruzi* nos triatomíneos. A curva padrão foi incluída em todos os ensaios quantitativos, em duplicatas para cada ponto da curva. Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e todas as placas de ensaios de qPCR contiveram controle positivo (10 fg DNA de *T. cruzi* CL-Brener/ μ L) e controles negativos (NTC: *Negative Template control* - 2 μ L água ultrapura e controle negativo

para *T. cruzi*: 2 µL DNA extraído a partir de 100 µL de extrato de intestino de triatomíneo não infectado).

3.1.7.6. Cultivo de células para curva padrão e controles da PCR

Células de *T. cruzi* CL- Brener, Dm28c, Y, INPA 3663, INPA 4167, LL014 e *T. rangeli* (cepa Macias), foram cultivadas em BOD (B.O.D. Mod. 347) (Fanem, São Paulo, Brasil) a 28°C em cultura axênica em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) (BD, Maryland, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino termodesativado (Cultilab, Campinas/SP, Brasil). As células foram cultivadas até atingirem a fase logarítmica de crescimento, após sucessivas passagens. No meio da fase logarítmica de cultivo, os parasitos foram centrifugados a 800 g durante 10 min, lavados três vezes com PBS (Tampão salina: Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2) e re-suspensos em 1 mL de PBS. Os epimastigotas foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e ajustados para uma concentração final na ordem de 10⁶ células/mL. As células foram armazenadas a -20°C até o momento de uso.

3.1.7.7. Análise estatística

Os dados da qPCR foram expressos como médias aritméticas ou mediana ± desvio padrão. Foram utilizados os testes *Mann–Whitney Rank Sum* ou *One-way ANOVA* para analisar a significância estatística. Um valor de *p* menor ou igual a 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram conduzidas com o programa *Sigmaplot Windows* versão 12.0 (Systat Software, Inc., California, USA).

3.1.8. Avaliação da fonte alimentar através de teste imunoenzimático

3.1.8.1. Primeira etapa de coleta (análise através das fezes dos triatomíneos)

As coletas iniciais foram realizadas durante o mês de janeiro. Período em que clima está mais seco e as temperaturas são mais elevadas. Os Insetos capturados nas localidades de estudo foram acondicionados individualmente e transportados até o laboratório onde foram identificados quanto ao estágio evolutivo e espécie. Em razão da necessidade da manutenção dos espécimes para formação de colônias e observação dos mesmos em ambiente laboratorial, optou-se pela coleta de amostras para análise de fonte alimentar a partir da compressão abdominal. Este método de obtenção de amostras permite trabalhar com o material presente somente na porção final do tubo digestivo. A quantidade de amostra é pequena e o sangue ingerido pelos insetos encontra-se bastante

degradado pelo processo digestivo. No entanto, a análise com este tipo de amostra é realizada quando não há a possibilidade de obtenção de material oriundo da dissecação dos insetos pela necessidade de mantê-los vivos. Foram obtidas amostras de 49 insetos, sendo todas ninfas de diversos estágios. Acrescentou-se ao material coletado, 50 microlitros de PBS (Solução Salina tamponada com fosfatos) 0,01 M, pH 7,2 e estas foram acondicionadas em microtubos de 500 microlitros e mantidas sob congelamento em freezer a -20°C até o momento da análise.

3.1.8.2. Segunda etapa de coletas (análise do conteúdo intestinal dissecado)

Até a realização da segunda coleta, no mês de agosto, período mais frio e chuvoso, as análises de fonte alimentar das amostras obtidas na primeira coleta, já haviam sido realizadas. Devido às características e quantidade das amostras, os resultados obtidos demonstraram sensibilidade aquém das características do método. Por esta razão, nesta coleta, optou-se pelas amostras de tubo digestivo, obtidas a partir da dissecação dos insetos. Este tipo de amostra foi possível nesta etapa do estudo, pois as colônias já haviam sido formadas e não havendo assim necessidade de manutenção dos insetos vivos.

Na segunda ida ao campo, foram analisadas amostras de 225 insetos, sendo 223 ninfas e 2 adultos. Os insetos foram acondicionados, mantidos e identificados como na primeira etapa. Após a obtenção das amostras, as mesmas foram também acrescidas de 50 microlitros de PBS e mantidas sob congelamento em freezer a -20°C até o momento da análise.

Para a realização do teste imunoenzimático (ELISA) foram testados triatomíneos das espécies de *T. rubrovaria* e *T. carvalhoi* ingurgitadas ou que apresentavam algum resíduo de alimentação sanguínea.

A técnica de ELISA foi realizada segundo o protocolo descrito por Burkot et al. (1981), modificado por Duarte (1997). O intestino médio posterior e o intestino posterior foram dissecados e embebidos em placas de Petri estéreis contendo 2 ml de solução fisiológica e 100 µg/mL 5- fluorocitosina. O homogenato também foi observado entre lâmina e lamínula para a visualização do parasito por microscopia óptica (aumento de 400 vezes).

O abdome de cada espécime foi dissecado e macerado em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2; 0,01M. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da análise. Em placas de micro diluição de poliestireno

de 96 cavidades (NuncC, 442404, maxisorp, Denmark), foram colocados 50µl das amostras diluídas a 1:20 em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6; 0,05M, Sigma). Em seguida, foram incubadas, por um período de 2 horas a 37°C sob condições de umidade. Após esta etapa de sensibilização, as microplacas foram lavadas com tampão de lavagem PBS/Tween 20 – 0,05% (Sigma Chemicals Co-St. Louis, USA) utilizando-se lavadora de microplacas semi-automática (Microplate Washer DNX – 9620, Perlong). Após a lavagem, anti-soros homólogos diluídos em tampão de diluição (PBS/Tween 20 – 0,05%/leite desnatado 1%- Molico-Nestlé, Brasil) foram adicionados as microplacas. Seguiu-se um período de incubação de 30 minutos, em estufa a 37°C em câmara úmida. Cada placa foi, retirada da estufa e lavada com o mesmo procedimento de lavagem anterior.

Em seguida, foram colocados 100µl de solução contendo conjugado (goat antirabbit serum peroxidase conjugate - Sigma Chemical USA) diluído 20.000 vezes em tampão de diluição. Foi realizado novo período de incubação como descrito na etapa anterior. Decorrido o tempo determinado, cada placa foi retirada da estufa, lavada com o mesmo procedimento anterior e em seguida foi acrescentada à solução reveladora, constituída de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes (Merck Diagnóstica-RJ, 64 Brasil) e 10 mg O-Phenylenediamine (OPD, Sigma Immunochemicals Co. USA) diluídos em tampão citrato/fosfato (pH 5,0; 0,05M, Sigma).

Cada placa permaneceu em câmara escura por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi bloqueada acrescentando-se 50µL de solução de ácido sulfúrico 1N. Em seguida foi realizada a leitura em absorvância utilizando-se leitora de microplacas (Test Line ELx 800), com filtro de leitura de 490nm e filtro de referência de 630nm.

Em todas as placas foram utilizados controles positivos, para cada reação. Este consiste de soro homólogo total diluído em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6; 0,05M, Sigma) 2000 vezes. Para sua validação foram esperados, para os controles positivos, valores de absorvância acima de 1,0.

Os anti-soros utilizados foram obtidos a partir da imunização de coelhos Nova Zelândia imunizados com antígenos do soro de galinha (*Gallus gallus* Linneous, 1758), cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758), humano (*Homo sapiens sapiens* Linnaeus, 1758), gambá (*Didelphis Marsupialis* Linnaeus, 1758) e roedor (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). Os soros imunes foram produzidos no Laboratório de Imunodiagnóstico / Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde

Pública Sérgio Arouca, FIOCRUZ (Protocolo CEUA/FIOCRUZ: 0068/00), onde permanecem aliquotados e armazenados em freezer a -20°C.

Para que fosse estimada a positividade das amostras, foi feito o cálculo baseado na média das absorbâncias obtidas a partir das reações observadas com os soros heterólogos somado a dois desvios padrão (*cut off point*). Este procedimento é adotado para excluir dos resultados as possíveis reações cruzadas e aumentar a especificidade do teste, obtendo conseqüentemente resultados mais confiáveis.

3.1.9. Aspectos sobre a biologia de *Triatoma carvalhoi*

Os espécimes foram coletados no estado do Rio Grande do Sul, no município de Encruzilhada do Sul (30°32'38"S; 52°31'19"O), mais especificamente em Cordilheira, nos ecótopos naturais e no peridomicílio. Os insetos foram mantidos a 26°C e 70% UR.

Para as análises biológicas utilizamos nove parâmetros: fertilidade, período de incubação, primeiro repasto sanguíneo, período de intermuda, número de refeições sanguíneas, resistência ao jejum, mortalidade, longevidade e ciclo de desenvolvimento.

Fertilidade - 16 fêmeas foram separadas individualmente em tubos de Borrel, fechados com rede de nylon e observadas diariamente, verificando a coloração dos ovos, se eclodem ou não. A oviposição destas fêmeas iniciaram-se depois do primeiro repasto.

Período de incubação - 60 ovos de oito fêmeas foram separados em tubos de Borrel fechados com rede de nylon, de acordo com a data de postura e observados diariamente até a eclosão.

Primeiro repasto sanguíneo - 30 ovos foram individualizados em cada tubo de Borrel. Após a eclosão, uma refeição de sangue foi oferecida a cada ninfa até 10 minutos. Camundongos suíços foram usados (Protocolo CEUA-FIOCRUZ LW-14).

Período de intermuda - 50 ninfas de cada estágio, 15 machos e 15 fêmeas foram separadas e colocadas em recipientes de plástico individuais (5.5 cm diâmetro x 10.5 cm altura) com o mesmo dia de eclosão ou ecdise. Papel de filtro foi utilizado para cobrir a superfície do recipiente. Os espécimes foram observados diariamente até as ecdises dos próximos estágios. O período de intermuda considerado foi o número de dias entre duas ecdises consecutivas.

Número de refeições sanguíneas - quantificados o número de refeições sanguíneas para cada estágio ninfal. A refeição sanguínea ocorreu uma vez por semana até a repleção.

Resistência ao jejum - foi considerado o período compreendido entre a ecdise e a morte do inseto. Os insetos foram alimentados em camundongos (*Mus musculus*) semanalmente, por um período de 60 – 80 minutos. Após a ecdise, as ninfas foram separadas de acordo com cada estágio (N = 50) e adultos (N = 30), acondicionados em tubos de Borrel, com o mesmo dia de ecdise, e observados diariamente até a morte.

Mortalidade - 177 ninfas de 1º estágio foram separadas e foi calculada de acordo com cada estágio de ninfa mudada até o adulto, considerando as mortes.

Longevidade - considerado o tempo decorrido desde cada muda para o estágio adulto até a sua morte.

Ciclo de desenvolvimento - os 60 ovos postos por fêmeas de campo de *T. carcavallo* foram selecionados aleatoriamente e colocados individualmente em recipientes de plástico, com papel de filtro dentro para proporcionar aos insetos em desenvolvimento o acesso à fonte de alimento. Cada recipiente foi numerado e examinado diariamente até a eclosão dos ovos. As ninfas foram observadas todos os dias e alimentadas semanalmente em camundongos até a repleção e o tempo para passar pelos diferentes estágios até à idade adulta foi registrado em dias. O tempo de desenvolvimento (total e por estágio) foi expresso em valores médios.

3.2. Atividades de educação

3.2.1. Atividade de Divulgação para a população

As pesquisas em 123 domicílios foram acompanhadas de um questionário (Anexo 1) sobre a procedência dos moradores, tempo de moradia e se conhecem o triatomíneo “bicho barbeiro”, dentre outras questões. O questionário foi aplicado em domicílios dos municípios de Caçapava do Sul (n = 30), Cachoeira do Sul (n = 30), Canguçu (n = 30), Lavras do Sul (n=30) e Encruzilhada do Sul (n = 02). Os moradores de todas as residências receberam esclarecimentos sobre a biologia dos barbeiros, em que tipos de locais podem ser encontrados e quais as medidas de controle que poderiam impedir que colonizassem o domicílio e o peridomicílio, acompanhados de *folder* explicativo e placa demonstrativa contendo fases do ciclo de vida do inseto.

3.2.2. Atividade de Capacitação com Integrantes da área de saúde dos municípios

As atividades com integrantes da área de saúde dos municípios se deram de duas formas:

- **Palestras** - ministradas aos profissionais de Saúde (médicos, enfermeiros, dentistas e Agentes Comunitários de Saúde) de postos de saúde da Família dos municípios, com intuito de sensibilizar estes profissionais sobre necessidade de mostrar à população a importância da prevenção da presença do inseto triatomíneo nos domicílios e peridomicílios;
- **Oficinas** – realizadas com os Agentes de Endemias que estão diretamente ligados a Campanha de Chagas. Foram aplicados questionários, pré-teste e pós-teste (Anexo 2) aos participantes com intuito de avaliar conhecimentos prévios sobre os insetos e a doença de Chagas e condições de trabalho.

4.0. RESULTADOS

4.1. Análise da fauna de triatomíneos

4.1.1. Triatomíneos coletados nas expedições de campo

As coletas foram realizadas entre junho de 2013 e agosto de 2016, as quais foram georreferenciadas de acordo com os municípios selecionadas (Tabela 2, Fig. 12), sendo coletados 2.112 exemplares.

Tabela 2: Municípios e localidades do Rio Grande do Sul, onde foram coletados Triatomíneos.

Município	Localização
Caçapava do Sul	30° 36' 13 S,7" ; 053° 48' 48,7" O
Cachoeira do Sul	30° 20' 49,4"; 052° 45' 04,0" O
Encruzilhada do Sul	30° 38' 32,1"; 052° 26' 50,8" O
Canguçu	31° 23' 58,2"; 052° 43' 06,5" O
Lavras do Sul	30° 36' 11,7"; 053° 47' 54,3" O
São Jerônimo	29° 57' 32"; 051° 43' 19" O

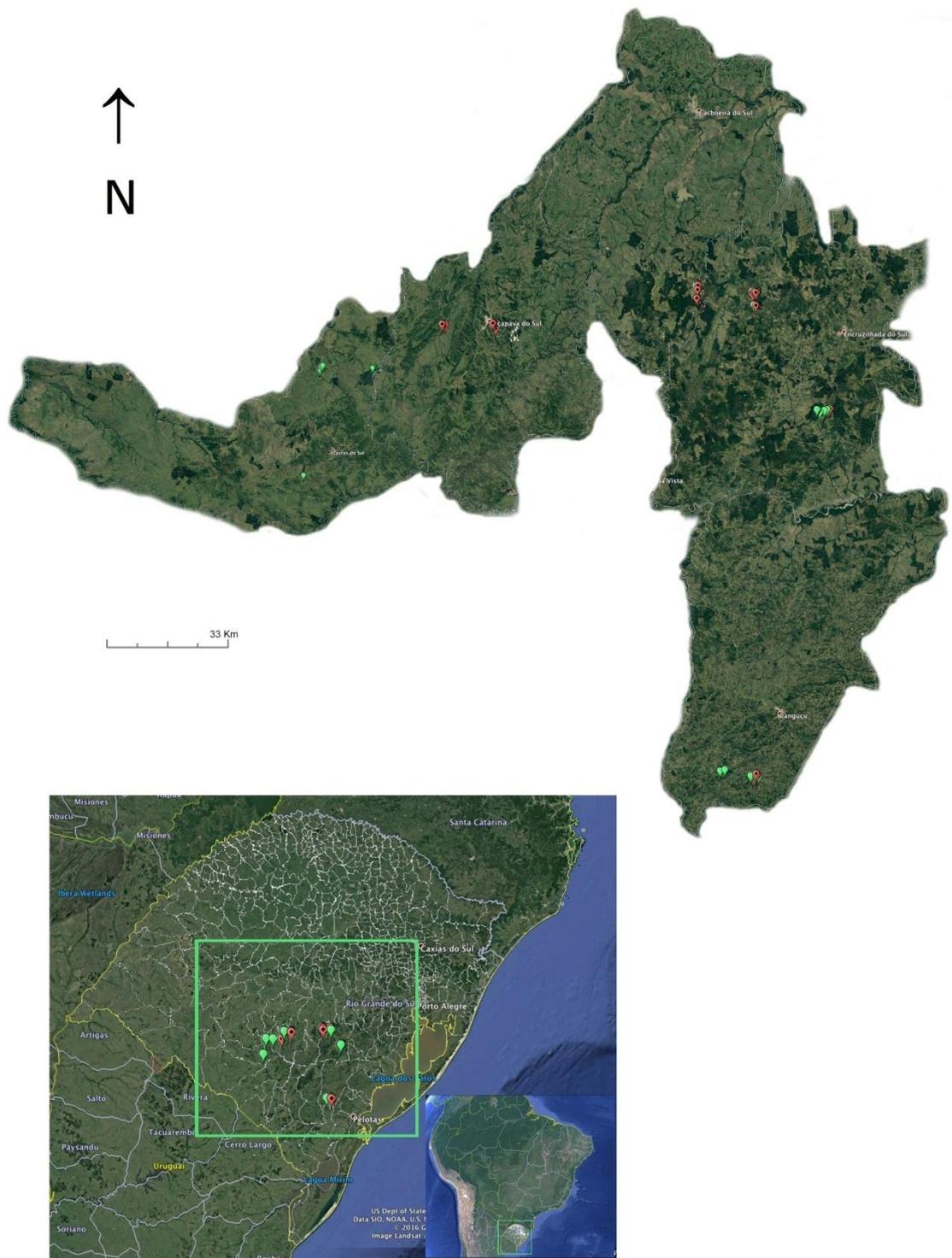


Figura 11 – Pontos de coleta dos triatomíneos no estado de Rio Grande do Sul.

As duas primeiras coletas foram realizadas de forma aleatória (junho de 2013 e abril de 2014) com o objetivo de estabelecimento da colônia para posterior utilização nos experimentos de laboratório (Tabela 3, Fig. 13). Neste período foram coletados 1.005 exemplares.

Tabela 3: Total de triatomíneos coletados nos seis municípios do estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2013 e 2014.

LOCALIDADE	Jun/2013							Abr/2014						TOTAL	
	Ninfas					Adultos		Ninfas					Adultos		
	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀	N1	N2	N3	N4	N5	♂		♀
Caçapava do Sul	36	2	0	0	14	2	1	2	2	29	3	22	0	0	113
Cachoeira do Sul	0	0	0	1	1	0	0	0	9	4	0	10	0	0	25
Canguçu	60	25	5	2	3	3	1	1	13	5	4	17	0	0	139
Encruzilhada do Sul	5	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1	8	0	0	17
Lavras do Sul	240	163	61	8	16	7	6	3	22	12	4	54	0	0	596
São Jerônimo	57	8	0	1	11	1	1	0	6	9	1	20	0	0	115
TOTAL	398	198	66	12	47	13	10	6	52	59	13	131	0	0	1005

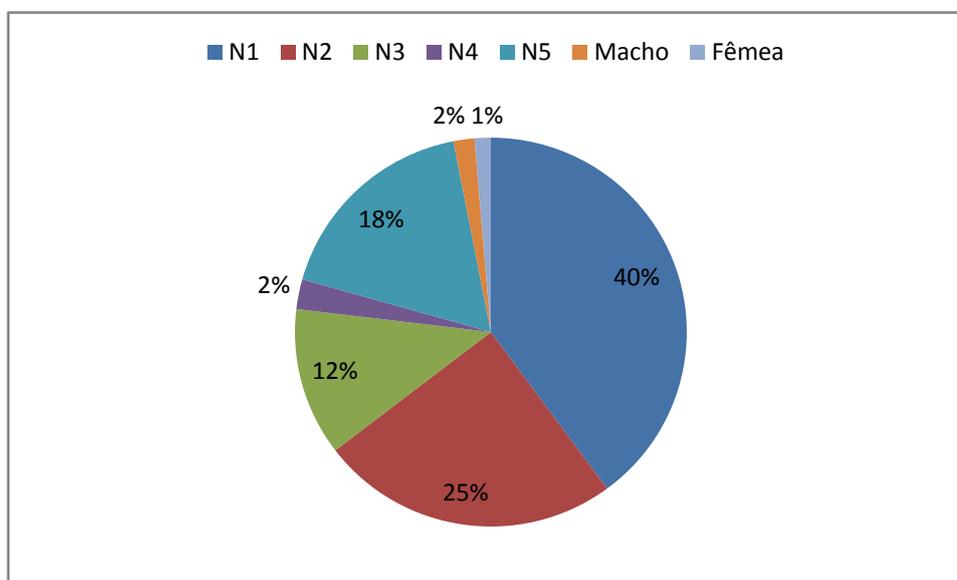


Figura 12 – Porcentagem relativa ao total de insetos obtidos nos seis municípios do estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2013 e 2014, de acordo com o estágio de desenvolvimento.

As coletas realizadas em janeiro e julho de 2015, e em janeiro e agosto de 2016 e totalizaram 2.112 exemplares (Tabela 4). Conforme informado na Tabela, as coletas foram realizadas sistematicamente com exceção do município de São Jerônimo, por questões de acessibilidade devido às chuvas. Com o objetivo de realizar uma análise temporal relacionada às variações de temperatura e precipitação da região a fim de observar se haveria correlação com estes fatores abióticos reunimos o total de ninfas e adultos coletados em cinco municípios retirando São Jerônimo da análise pelas razões expostas acima. Desta forma foram gerados os gráficos das Figuras 14 e 15.

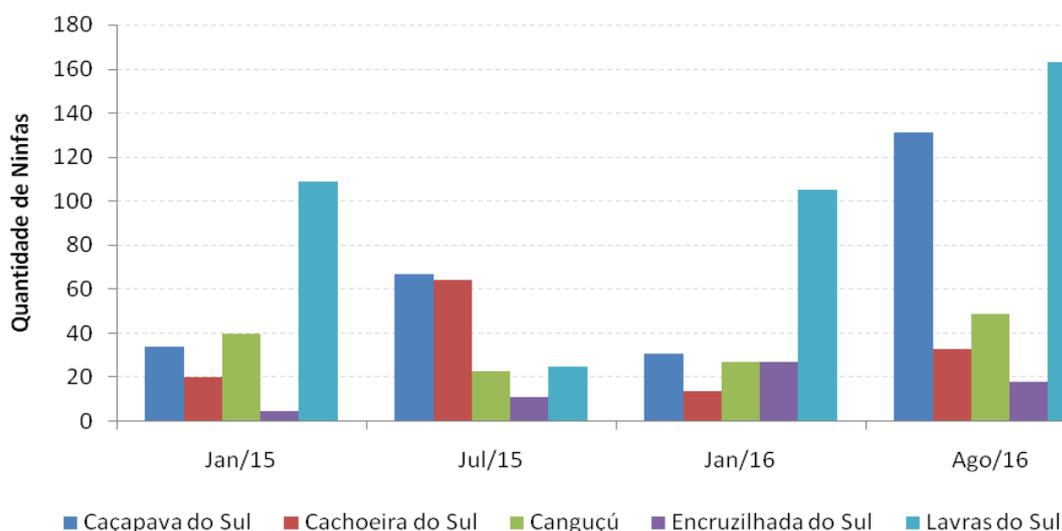


Figura 13 – Total consolidado de ninfas (N1 a N5) coletadas em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul durante o período 2015 - 2016.

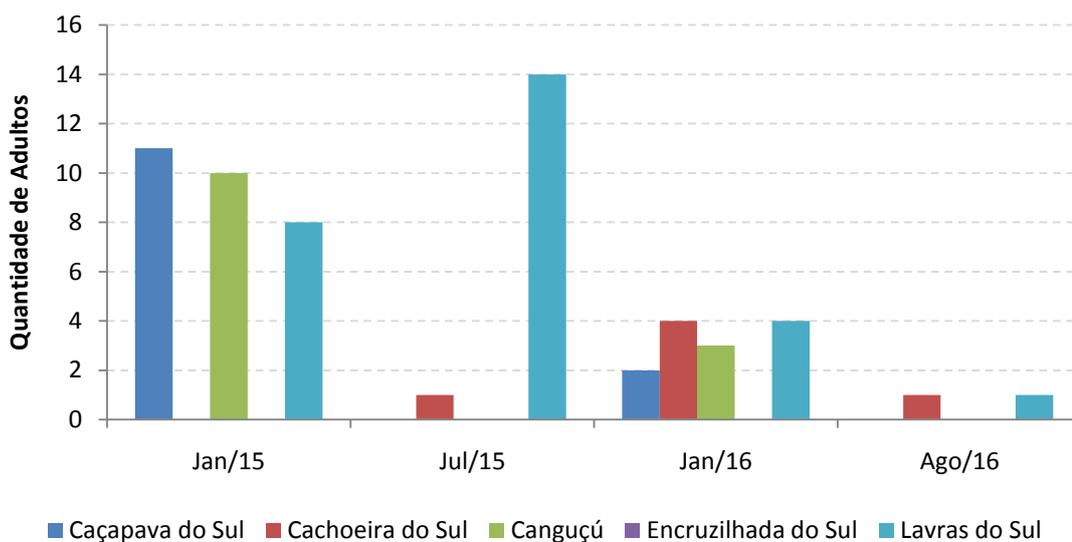


Figura 14 – Total consolidado de adultos (machos e fêmeas) coletados em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul durante o período 2015 - 2016.

Tabela 4: Total de triatomíneos coletados nos seis municípios do estado do Rio Grande do Sul, no período de junho de 2013 a agosto de 2016

LOCALIDADE	Jan/2015								Jul/2015								Jan/2016								Ago/2016								TOTAL
	Ninfas					Adultos			Ninfas					Adultos			Ninfas					Adultos											
	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀					
Caçapava do Sul	8	15	1	3	7	3	8	12	16	7	0	32	0	0	2	7	0	10	12	0	2	25	43	10	3	50	0	0	389				
Cachoeira do Sul	1	3	3	0	13	0	0	7	13	21	6	17	0	1	0	1	3	0	10	1	3	3	7	4	1	18	0	1	162				
Canguçu	6	11	2	9	12	4	6	2	6	1	3	11	0	0	0	0	5	10	12	2	1	4	19	0	0	26	0	0	291				
Encruzilhada do Sul	0	0	2	0	3	0	0	0	3	1	2	5	0	0	0	0	2	10	15	0	0	1	9	2	2	4	0	0	78				
Lavras do Sul	20	19	29	9	32	5	3	1	0	2	6	16	6	8	12	15	13	30	35	2	2	20	27	20	28	68	1	0	1025				
São Jerônimo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	6	11	6	1	28	0	0	167				
TOTAL	35	48	37	21	67	12	17	22	38	32	17	81	6	9	14	23	23	60	84	5	8	59	116	42	35	194	1	1	2112				

Além destes confeccionamos um gráfico (Fig. 16) através de dados obtidos no site do INMET (www.inmet.gov.br) utilizando a estação metereológica (OMM:83964-Encruzilhada do Sul) latitude:-30.53 e longitude:-52.51 a 427.75 m de altitude. O gráfico resume a média de temperatura, temperatura máxima e mínima e precipitação no período de dois anos (período de coleta).

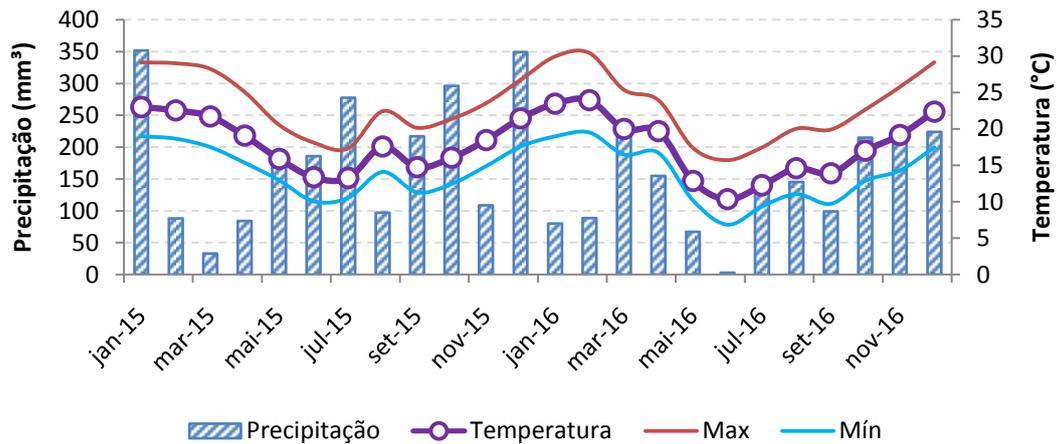


Figura 15 – Média de temperatura, temperaturas máximas e mínimas e precipitação durante o período 2015 - 2016.

Com os dados gerados se verificou a abundancia de ninfas e adultos coletados em cada minucípio com o período estacional correspondente (verão ou inverno), Figuras 17 e 18.

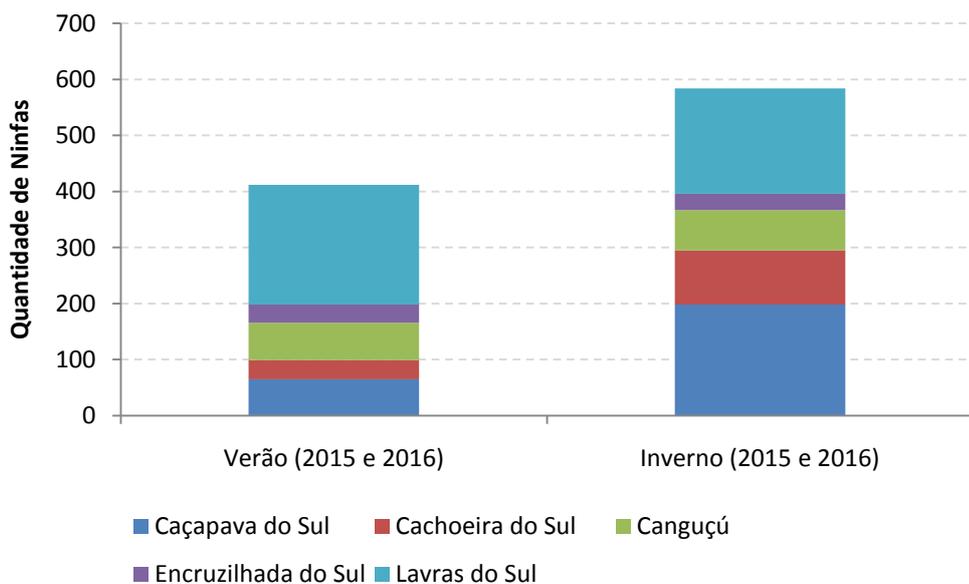


Figura 16 – Abundância de ninfas coletadas nos durante o verão e inverno no período 2015 - 2016.

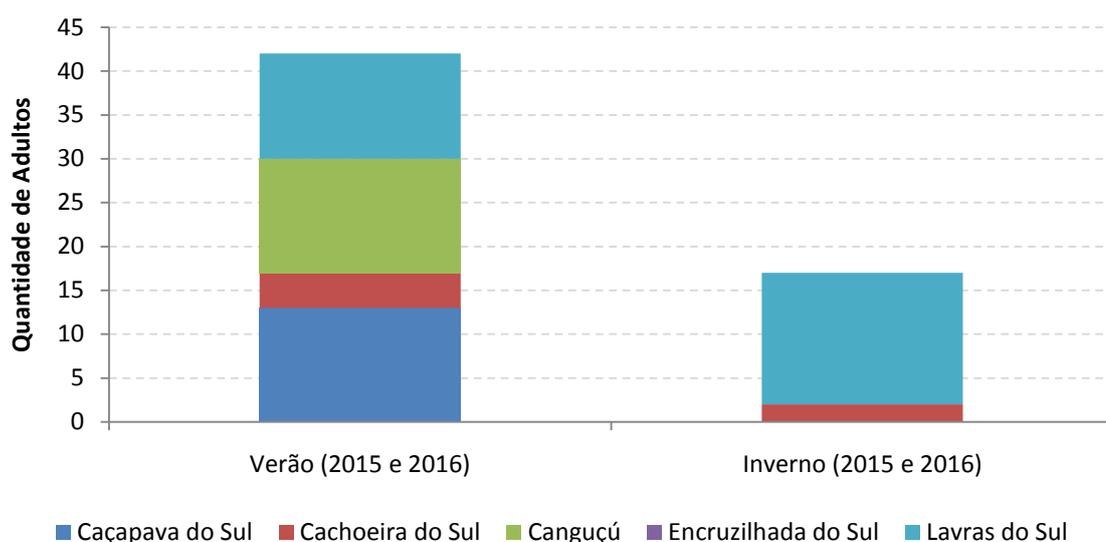


Figura 17 – Abundancia de adultos coletados durante o (verão e inverno no período 2015 - 2016).

Os resultados indicam que o maior número de ninfas foi encontrado no período frio (inverno) enquanto que a maioria dos adultos foi encontrada no período quente (verão), em uma relação inversamente proporcional.

Tabela 5: Total de triatomíneos coletados em duas estações do ano

	Ninfas	Adultos	Total
Verão	412	42	454
Inverno	594	17	611
Total	1006	59	1065

As unidades domiciliares dos municípios estudados eram construídas em sua maioria de madeira (Fig. 19), tendo sido avaliadas 30 em cada município, com exceção de Encruzilhada do Sul, onde foram vistoriadas apenas 3 domicílios. As pesquisas realizadas em todos os intradomicílios não revelaram a presença de triatomíneos. Nos peridomicílios foram avaliados currais de animais (gado bovino e equino, galinheiros,

chiqueiros, amontoados de telhas e anexos (Fig. 20). Os demais animais presentes tais como ovelhas, patos e ema ficavam soltos nos pastos.



Figura 18 – Unidades domiciliares (UD).



Figura 19 – Locais de coletas dos tiatomíneos no peridomicílio.

Todos os 3.117 exemplares foram encontrados em ambiente considerado silvestre, entretanto, algumas unidades domiciliares (UD), estão localizadas muito próximas a estes ambientes, muitas vezes sendo difícil delimitar o que é ambiente silvestre e o que é peridomicílio (Fig. 21).



Figura 20 – Ambiente silvestre próximo às unidades domiciliares (UDs).

O ecótopo silvestre estava composto principalmente de afloramentos rochosos onde foi encontrada a maioria dos triatomíneos coletados independente da estação do ano (Figs. 22, 23, 24).



Figura 21 - Coletas no ambiente silvestre onde foi registrado o encontro de triatomíneos nos afloramentos rochosos, durante Janeiro de 2015.



Figura 22 - Coletas em Janeiro de 2015, no ambiente silvestre, encontrando positividade nos afloramentos rochosos.



Figura 23 - Coletas em Julho de 2015, no ambiente silvestre, encontrando infestação nos afloramentos rochosos.

4.1.2. *T. infestans* coletados em foco no Município de Santa Rosa

A equipe do Centro Estadual de Vigilância em Saúde da Secretaria Estadual de Saúde, em 13 de maio de 2014, capturou exemplares de *T. infestans* (Fig. 25), no município de Santa Rosa, estado do Rio Grande do Sul, como objetivo do Plano Nacional de Controle da Doença de Chagas (PNCDCh) entre as coletas PNCDCh n°140129 e PNCDCh n°140130. O domicílio estava localizado a 27°52'47.3"S 54°38'17.3"O, em área baixa, com potreiro em volta e área agrícola. O material de construção da casa era de madeira com cobertura de telha e com cinco anexos construídos com os mesmos materiais. No peridomicílio, foram encontraram dois anexos infestados com *T. infestans*, uma estrebaria e um chiqueiro de porcos. O chiqueiro de porcos se encontrava a aproximadamente 15 metros da casa e a estrebaria a cerca de 40 metros da casa. Este último anexo possuía tábuas amontoadas e galinhas dormindo em cima. No mesmo pátio havia outra casa também de madeira e telhas, situada acerca de 100 metros de distância da casa descrita onde não foi registrada a presença de *T. infestans*.



Figura 24 – Coleta de *Triatoma infestans* no município de Santa Rosa.

Foram coletados 275 exemplares de *T. infestans* (Fig. 26), sendo: 27 ninfas de 1° estágio, 44 ninfas de 2° estágio, 46 ninfas de 3° estágio, 38 ninfas de 4° estágio, 70 ninfas de 5° estágio e 50 adultos: 20 fêmeas e 30 machos.



Figura 25 – *Triatoma infestans* coletados no município de Santa Rosa.

4.1.3. Análise do total da fauna de Triatomíneos obtida no estudo de campo e no foco

O total de triatomíneos coletados durante o período de 2013 a 2016 nos sete municípios foi de 3.392. Os municípios que apresentaram os maiores números de insetos coletados foram Lavras do Sul, com 1.621, seguido de Caçapava do Sul com 502 (Fig. 27).

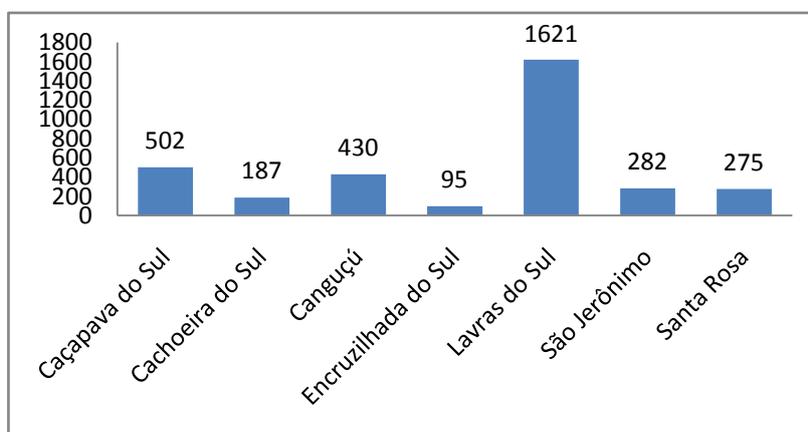


Figura 26 – Total de triatomíneos coletados durante o período de 2013 a 2016 nos sete municípios.

Em relação ao total os exemplares adultos coletados 55 (cinquenta e cinco) eram da espécie *T. rubrovaria*, 25 *T. carvalhoi*, 2 *T. circummaculata* e 50 *T. infestans*, distribuídos nos municípios conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Distribuição dos adultos de triatomíneos por município no estado do Rio Grande do Sul.

Município	<i>Triatoma rubrovaria</i>		<i>Triatoma carvalhoi</i>		<i>Triatoma circummaculata</i>		<i>Triatoma infestans</i>	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Caçapava do Sul	5	11	-	-	-	-	-	-
Cachoeira do Sul	-	3	-	1	1	1	-	-
Canguçu	4	3	5	5	-	-	-	-
Encruzilhada do Sul	-	-	-	1	-	-	-	-
Lavras do Sul	13	14	8	5	-	-	-	-
São Jerônimo	1	1	-	-	-	-	-	-
Santa Rosa	-	-	-	-	-	-	30	20
Total	23	32	13	12	1	1	30	20

Após o estabelecimento das colônias em laboratório, dos triatomíneos coletados chegaram ao estágio adulto 807 exemplares sendo estes 645 *T. rubrovaria* (443 machos e 202 fêmeas) e 162 *T. carvalhoi* (109 machos e 53 fêmeas). Não foi obtido nenhum exemplar adulto de *T. circummaculata*.

4.2. Avaliação da infecção por *T. cruzi*

De um total de 400 exemplares de triatomíneos foram analisados 33 *T. carvalhoi*, 9 *T. circummaculata*, 7 *T. rubrovaria*, 123 *T. infestans*. Foram analisadas 228 ninfas que não foram classificadas devido à dificuldade para a identificação deste estágio. O exame a fresco realizado por microscopia ótica revelou ausência de parasita para as três espécies do “subcomplexo rubrovaria”, só sendo detectada infecção em dois exemplares adultos de *T. infestans* (6,7%).

Após a padronização de ambos os protocolos, PCR convencional em *multiplex* e sistema TaqMan *multiplex* de qPCR, foi realizado o diagnóstico molecular. Trinta amostras foram infectadas com *T. cruzi* e em 370 não se detectou o parasito. Na Figura 28 visualiza-se gel de agarose exemplificando o resultado da PCR.

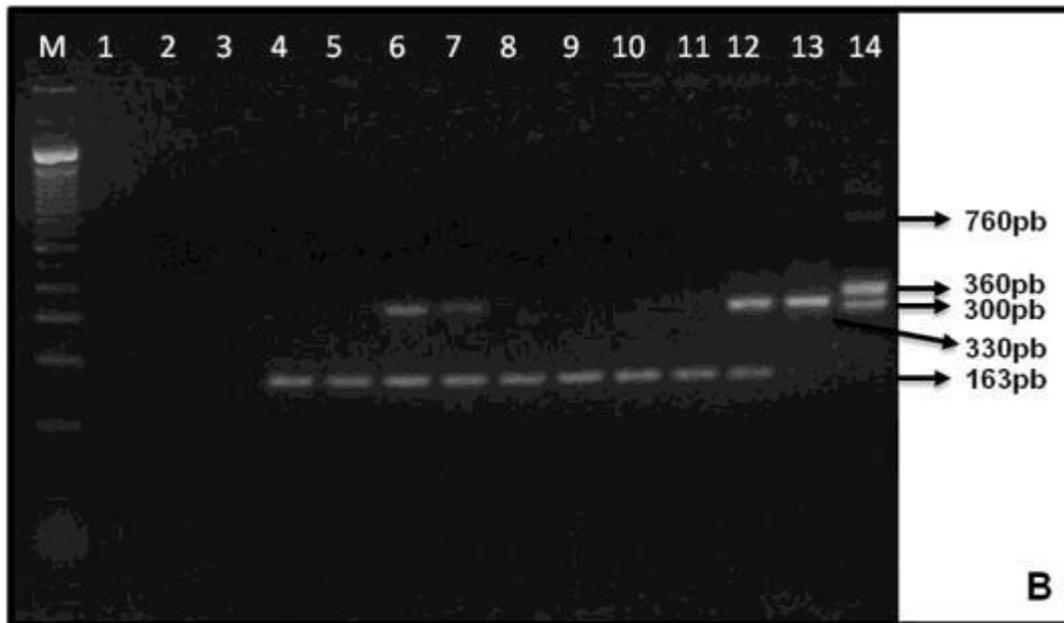


Figura 27: Exemplo de revelação dos resultados da PCR convencional para avaliar infecção natural em triatomíneos. Gel de agarose 2% corado com Nancy.

Triatomíneos coletados no município de Lavras do Sul, Rio Grande do Sul – M: Marcador de peso molecular (100pb); **1 e 2:** Controles negativos da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril); **3:** Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo); **4, 5, 8 a 11:** Insetos não infectados; **6 e 7:** *T. rubrovaria* infectados; **12:** Controle positivo de infecção (DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* Cl-Brener, 105 parasitos/mL); **13:** Controle positivo de *T. cruzi* (DNA extraído de epimastigotas Cl-Brener, 105 parasitos/mL); **14:** Controle positivo de *T. rangeli* (DNA extraído Cepa Macias, 105 parasitos/mL).

A taxa de infecção natural por *T. cruzi* foi superior entre aqueles triatomíneos pertencentes à espécie *T. rubrovaria* (4/7; 57,1%), seguido de *T. circummaculata* (3/9; 33,3%), *T. infestans* (10/123; 8,1%) e *T. carcavalloi* (2/33; 6,1%), sendo o primeiro informe de detecção de *T. cruzi* em *T. carcavalloi*. Entre as 228 espécies não identificadas, **11** foram infectadas com *T. cruzi*, perfazendo uma taxa de infecção de 4,8% (Fig. 29).

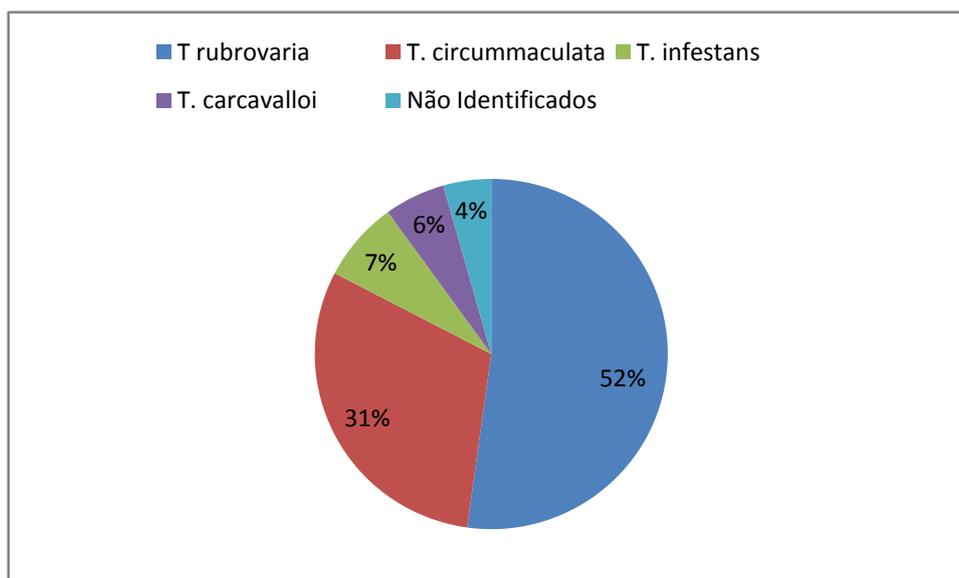


Figura 28 – Infecção por *Trypanosoma cruzi* de espécimes coletados em municípios do estado do Rio Grande do Sul, utilizando PCR.

4.3. Avaliação da Fonte Alimentar

Na primeira etapa de coleta, ao realizar a metodologia de obtenção de fezes dos triatomíneos para avaliação da fonte alimentar, 49 exemplares dos municípios de Lavras do Sul, Canguçu e Encruzilhada do Sul foram analisados, obtendo-se 12 amostras infectadas (24,5%), entretanto em 37 não foi detectado *T. cruzi* (55,5%). Os resultados correspondentes às fontes alimentares, mostraram a maior frequência de alimentação em ave, ovelha e roedor, sendo a fonte mais frequente ovelha (Tabela 7).

Tabela 7 – Identificação da fonte alimentar mediante o teste ELISA, de acordo com o estágio de desenvolvimento.

Fontes Alimentares	Municípios		
	Lavras do Sul	Canguçu	Encruzilhada do Sul
Ave	1		
Roedor		1	
Ovelha	6		2
Ave/ovelha	2		
Total	9	1	2

A partir da segunda coleta a metodologia seguida foi a dissecação do intestino dos triatomíneos, tendo sido realizada a análise de 224 exemplares, sendo 223 ninfas e 2 adultos da espécie *T. rubrovaria*.

Após a coleta, acrescentou-se 50 microlitros de PBS (Salina tamponada com fosfatos) 0,01M, pH 7,2. As amostras foram mantidas sob congelamento em freezer a -20° até o momento da análise.

Para a realização dos testes, foram utilizados 11 antissoros diferentes. Cada um destes, contendo anticorpos anti: ave, cabra, cão, cavalo, gambá, gato, humano, ovelha, réptil, roedor e tatu. Cada amostra foi submetida aos 11 antissoros, totalizando 2.475 análises.

Do total de triatomíneos analisados, 75,6 % apresentaram reatividade para um ou mais dos antissoros testados e 24,4 % não apresentaram reatividade. A fonte alimentar mais frequente foi ave (84,7 %), seguida de ovelha (7,3 %). Em 21 insetos (12,8 %) observou-se reatividade para mais de uma fonte (Tabela 8, Tabela 9).

No município de Lavras do Sul, onde foi coletado o maior número de triatomíneos (110), 69% das amostras apresentaram reatividade, sendo destas 48 (63,1%) reativas para ave.

Tabela 8 – Múltiplas fontes alimentares identificadas através do teste de ELISA.

Número de amostras não reagentes	Número de amostras reagentes na análise de fonte alimentar	Total
41	184	225
	Ave	139
	ovelha	12
Fontes mais frequentes	Ave combinada a outras fontes	13
	Ovelha combinada a outras fontes	8

Tabela 9 – Identificação das fontes alimentares dos triatomíneos coletados em 6 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, de acordo com o estágio de desenvolvimento (análise do conteúdo intestinal).

Fontes Alimentares	Municípios												Total
	Lavras do Sul		Caçapava do Sul		Canguçu		Cachoeira do Sul		Encruzilhada do Sul		São Jerônimo		
	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	
Ave	48	--	33	--	23	--	12	--	11	--	12	--	139
Cavalo	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Cão	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
Gambá	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	--	3
Ovelha	12	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	12
Réptil	--	--	1	--	--	--	1	--	--	--	--	--	2
Tatu	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
Ave/ovelha	4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4
Ave/Cão	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/Gambá	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/Humano	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/Réptil	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/cavalo	--	--	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/Tatu	--	--	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Gambá/Tatu	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ovelha/Tatu	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/Réptil/Ovelha	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
Ave/Ovelha/Tatu	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2
Não Reativas	32	1	5	--	0	--	1	--	2	--	12	--	43
Total	108	1	41	0	23	0	14	0	13	0	25	0	225

4.4. Biologia de *Triatoma carcavallo*

Os resultados obtidos para o parâmetro fertilidade mostraram que dentre as 16 fêmeas selecionadas a primeira oviposição ocorreu em seis dias. O número médio de ovos/semana foi 30. O maior número de ovos/semana foi observado durante os meses mais quentes (outubro a março). É importante mencionar que os ovos que não eclodiram eram férteis, pois a coloração foi a mesma para todos, rosa claro e sua cor se tornou vermelha de acordo com a progressão do processo de embriogênese. Os ovos tinham a forma elipsóide e estavam presos ao substrato. A oviposição dessas fêmeas começou após o primeiro repasto sanguíneo.

Na avaliação do período de incubação dos ovos, obtidos das 8 fêmeas selecionadas, a média dos espécimes foi 22.7 dias, com o mínimo de 21 e o máximo de 26 dias. Dos 60 ovos observados, 38.3% eclodiram (Tabela 11).

Tabela 10: Período de incubação dos ovos obtidos de 8 fêmeas de *Triatoma carcavallo* (em dias).

Postura	Quantidade total de ovos/dia	Nº de ovos eclodidos	Período de Incubação
1 ^a	10	03	24
		01	26
2 ^a	10	01	21
		01	23
		04	21
3 ^a	17	01	23
		03	24
4 ^a	01	-	-
5 ^a	20	03	21
		03	22
		01	23
6 ^a	02	01	25
		01	23
TOTAL	60	23	26

As ninfas de primeiro estágio obtiveram seu primeiro repasto sanguíneo uma média de 24 dias e em outros estágios ninfais uma média de 3,13 dias para o primeiro dia de refeição sanguínea, com um mínimo de um dia e um máximo de cinco dias.

Na avaliação do período de intermuda, entre as 50 ninfas observadas, oito morreram antes de atingir a fase adulta: três N1, quatro N2 e uma N3. O menor período

de intermuda foi observado entre ninfas de 1^o/2^o estágios (18,52 dias) e o maior entre o 5^o estágio/idade adulta (193,43 dias) (Tabela 12). As ninfas de 5^o estágio exigiram várias refeições sanguíneas, a fim de realizar a muda, o que ocorreu após 365 dias.

Tabela 11 – Período de intermuda de *Triatoma carcavallo* (dias).

Estádios	N	Duração em dias			SD
		Mínimo	Máxima	Média	
1 ^o	50	15	24	18,52	2,34
2 ^o	47	25	95	62,77	18,45
3 ^o	43	44	138	86,93	19,00
4 ^o	42	55	189	119,05	36,38
5 ^o	42	59	295	193,43	70,33

N = n^o de ninfas; SD = desvio padrão.

Para quantificação do número de refeições sanguíneas observamos que o mínimo ocorreu em fêmeas e machos com 0 e 1, respectivamente, enquanto o número máximo em ninfas de 5^o estágio com 42 refeições. A média geral de alimentações durante todo o desenvolvimento ninfal foi de 13,4 (Fig. 30).

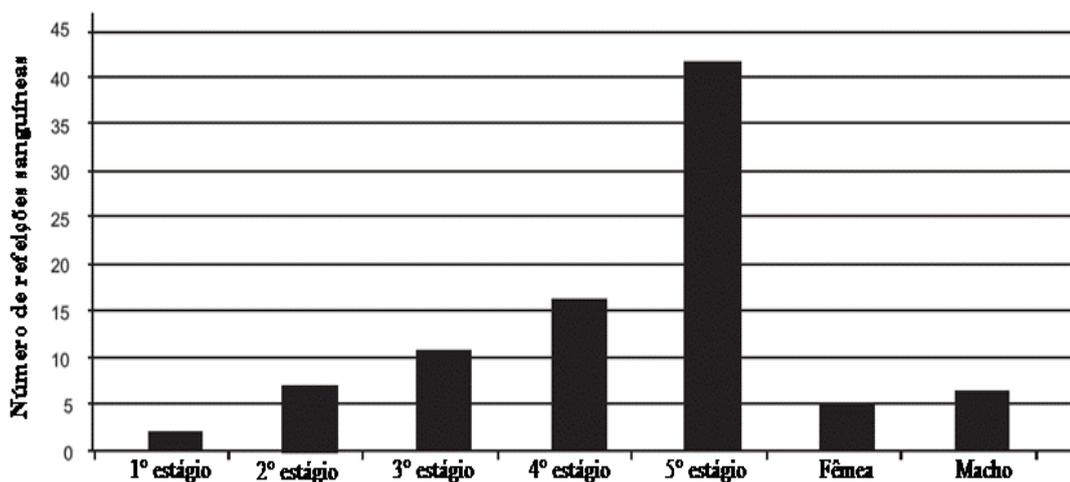


Figura 29 – Número de refeições sanguíneas de acordo com cada estágio ninfal em *Triatoma carcavallo*.

Os resultados da resistência ao jejum indicam que as ninfas de 3^o, 4^o e 5^o estágios apresentaram mais resistência que os adultos, enquanto os machos mostraram

resistência semelhante às ninfas de 1° e 2° estágios e foram menos resistente em geral do que as fêmeas (Tabela 13). O período total de observação foi de oito meses.

Tabela 12 – Resistência ao jejum de *Triatoma carcavalloi* (dias).

Estádios	N	Mínimo	Máximo	Média	S
N1	50	15	59	37	15,52
N2	50	10	116	50	29,72
N3	50	03	128	65,5	37,54
N4	50	58	210	134	54,25
N5	50	07	185	146	43,08
♀	30	21	81	61	18,30
♂	30	04	81	42,5	18,24

N = nº de exemplares; S = desvio padrão; ♀ = fêmea; ♂ = macho

Em relação à análise de mortalidade, iniciamos com 177 ninfas de *T. carcavalloi* e somente 95 atingiram a fase adulta (a taxa de mortalidade global foi de 57,2%). A mortalidade de cada estágio variou de 4,0 a 22,2% e a maior taxa de mortalidade foi registrada em N3 (22,2%), seguida por N2 (14,0%) (Tabela 14).

Tabela 13 – Mortalidade de *Triatoma carcavalloi*.

Estádios	N	n	Mortalidade (%)	Mortalidade acumulada
N1	177	157	11,3	11,3
N2	157	135	14,0	25,3
N3	135	105	22,2	47,5
N4	105	99	5,7	53,2
N5	99	95	4,0	57,2

N = nº de ninfas; n = número de ninfas que mudam para os seguintes estágios.

Na verificação da longevidade, a sobrevivência média dos adultos foi de 25,6 semanas (179,2 dias). Os machos apresentaram maior tempo de vida, com uma sobrevida média de 25,6 semanas, enquanto as fêmeas apresentaram uma média foi de 23,1 semanas (161,7 dias).

Durante o ciclo de desenvolvimento de *T. carcavalloi*, foram observadas diferenças em N5, onde a média de desenvolvimento foi de 193,43 (27 semanas). O ciclo de vida total foi de 503,4 dias (72 semanas) (Tabela 15).

Tabela 14 – Ciclo de desenvolvimento de *Triatoma carvalhoi*.

Estágios	N	Média (dias)	Quantil 25% - 75%
Ovos	60	22,7	21 - 26
N1	50	18,52	15 - 24
N2	47	62,77	25 - 95
N3	43	86,93	44 - 138
N4	42	119,05	55 - 189
N5	42	193,43	59 - 295
Total	42	503,4	219 - 757

N = nº de ninfas.

4.5. Atividades de Educação em Saúde

4.5.1 Divulgação para a população

Foram aplicados questionários (Fig. 31) nas 122 unidades domiciliárias nos municípios de Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Canguçu e Encruzilhada do Sul entre os dias 19 e 27 de janeiro de 2015 (Os questionários encontram-se no Anexo 1). As pessoas entrevistadas tinham entre 12 e 82 anos, sendo a maioria com mais de 40 anos. No município de Caçapava do Sul foram encontrados os entrevistados mais idosos. Mais de 90% dos entrevistados reconheceu um triatomíneo adulto, mas não reconheceu uma ninfa. Cerca de 70% das pessoas entrevistadas sabiam dizer o nome da doença transmitida pelo barbeiro. Mais de 70% responderam que para evitar a presença do barbeiro dentro da casa deve utilizar inseticida. Em relação à transmissão da doença de Chagas mais de 60% não tem conhecimento. Uma senhora de 77 anos entrevistada possuía doença de Chagas.



Figura 30 - Aplicação dos questionários.

Durante a aplicação dos questionários, as respostas relativas aos conhecimentos sobre os barbeiros podem ser visualizadas na Figura 32.

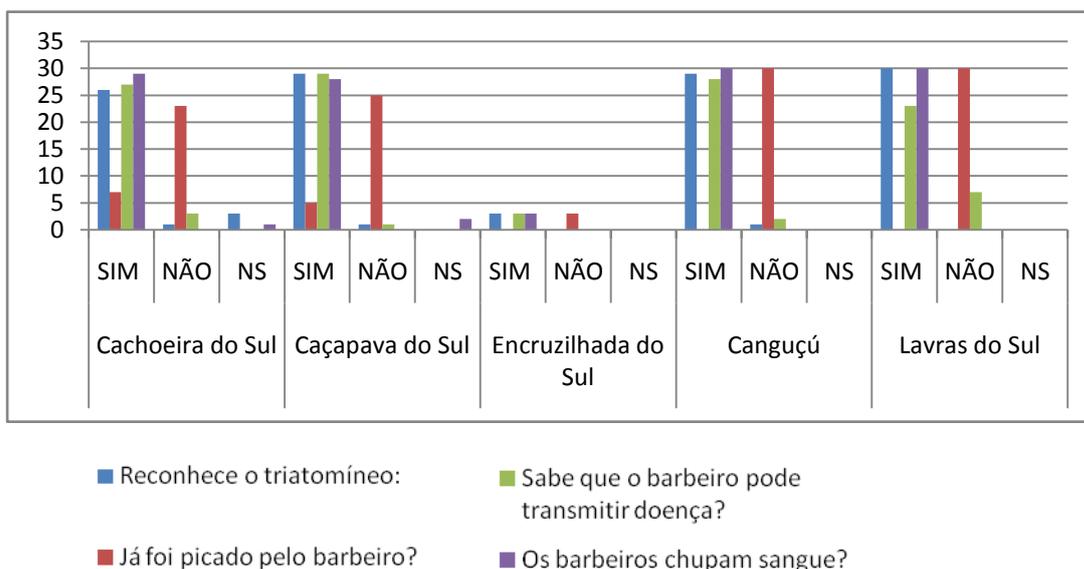


Figura 31 – Avaliação do conhecimento da população sobre o inseto barbeiro.

Ao serem questionados sobre a preferência dos barbeiros para se refugiar dentro da casa, dos moradores citou os locais exceto em Caçapava e Lavras do Sul, onde a maioria não soube citar (Fig. 33).

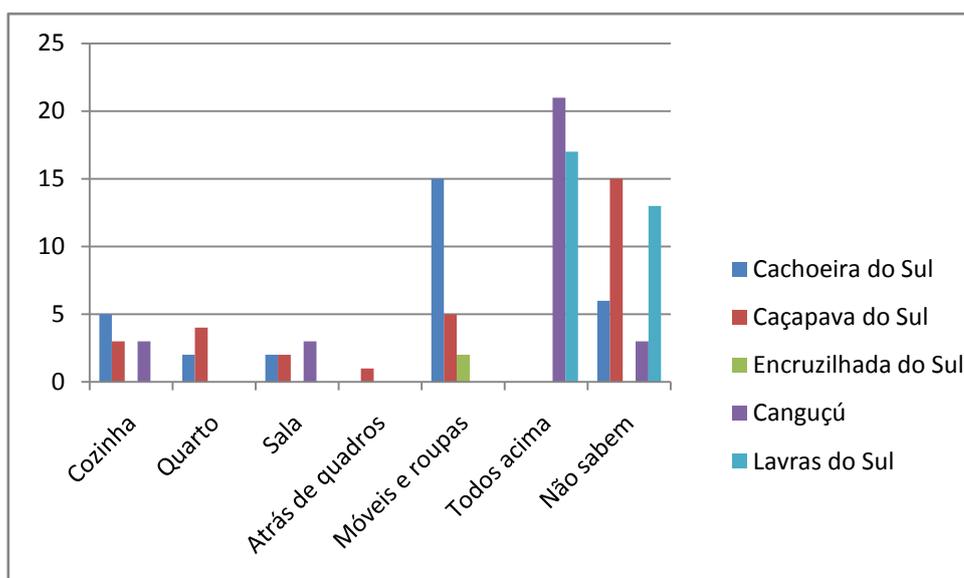


Figura 32 – Avaliação do conhecimento da população sobre onde o inseto barbeiro se localiza no domicílio.

Os resultados obtidos ao perguntar sobre a ocorrência do inseto barbeiro fora do domicílio se observa na Fig. 34.

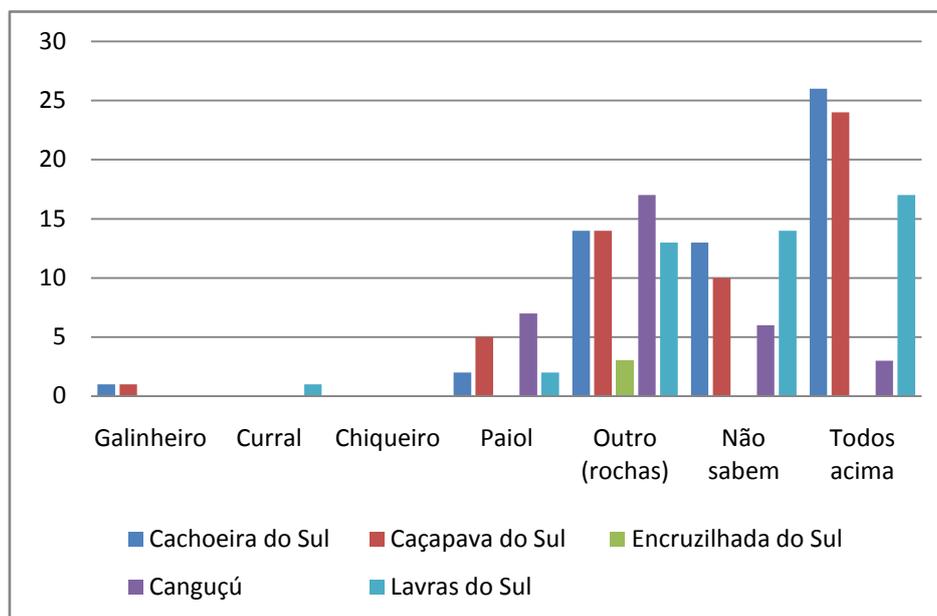


Figura 33 – Avaliação do conhecimento da população sobre onde o inseto barbeiro se localiza fora do domicílio.

Em relação ao conhecimento sobre como os barbeiros se alimentavam, a maioria da população dos municípios de Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul e Lavras do Sul, indicaram mais de uma fonte (Fig. 35).

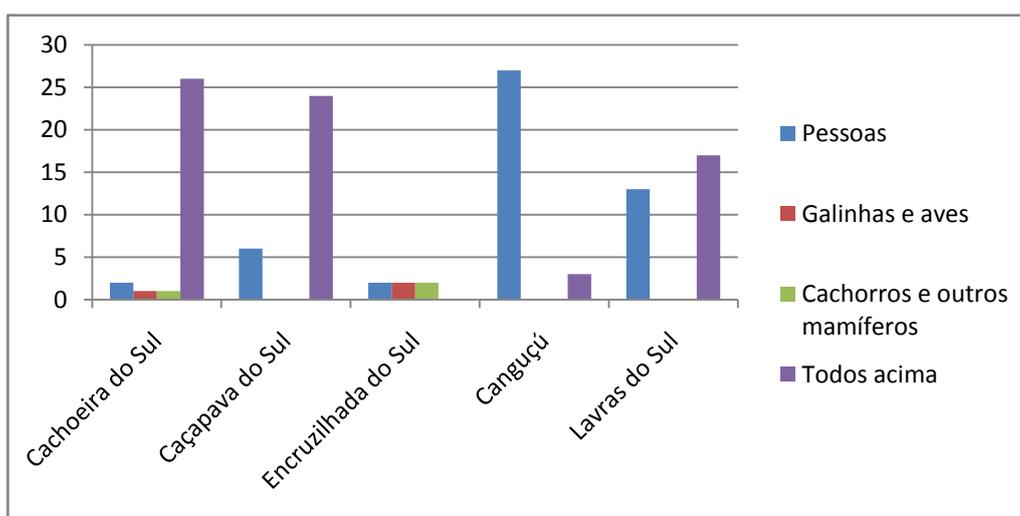


Figura 34 – Avaliação do conhecimento da população sobre a fonte alimentar do barbeiro.

Durante a visita para aplicação dos questionários, a equipe apresentava aos moradores uma placa contendo o ciclo de vida do triatomíneo, composto de ovos, os cinco estádios ninfais e adultos machos e fêmeas (Fig. 36). Nestas, a maioria reconhecia os adultos, porém não as ninfas. Também foi apresentado e distribuído aos moradores um folder explicativo contendo diversas informações sobre o barbeiro e a doença de Chagas (Anexo 3).



Figura 35 - Apresentação dos barbeiros para população durante visita para aplicação do questionário.

4.5.2. Atividade de Capacitação para Profissionais da área de saúde

Foram realizadas 2 oficinas e 2 palestras (Figs. 37, 38, 39, 40). Na aplicação do pré-teste, aproximadamente 42% dos agentes não sabiam que tipo de inseto era o barbeiro. Mais de 20% dos agentes achavam que o barbeiro era um besouro. Mais de 30% sabiam que o barbeiro é um percevejo. Todos os agentes sabiam que o barbeiro transmite a doença de Chagas.

Após as palestras e oficinas, foi realizado um pós-teste com as mesmas perguntas feitas no pré-teste obtendo 95% de acerto. O pré-teste e o pós teste encontram-se no Anexo 2.



Figura 36 - Oficina realizada com os Agentes de Saúde.



Figura 37 - Oficina realizada com os Agentes de Saúde.



Figura 38 - Palestra realizada com os Profissionais da área de Saúde.



Figura 39 - Palestra realizada com os profissionais da Área de Saúde.

5.0. DISCUSSÃO

Na avaliação da epidemiologia da doença de Chagas deve-se levar em conta os vetores, os triatomíneos; o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*; e os reservatórios silvestres e sinantrópicos, os mamíferos. Aliados a eles, o desenvolvimento industrial, crescimento populacional e a colonização de áreas rurais, proporcionam condições favoráveis para o estabelecimento da doença uma vez que afetam o equilíbrio ecológico (Barretto 1967, Ávila-Pires 1976).

Sabe-se que a infecção por *T. cruzi* ocorria como inicialmente como uma enzootia, restrita aos mamíferos silvestres, sendo transmitida por triatomíneos, também silvestres. À medida que o homem invadiu o habitat silvestre, realizando desmatamento e conseqüentemente alterando o equilíbrio ecológico, favoreceu a aproximação dos vetores ao peridomicílio e ao domicílio, caracterizando então a doença, como uma zoonose. Sendo assim, a doença que circulava apenas no ambiente silvestre entre os mamíferos e vetores silvestres passa a fazer parte de um ciclo domiciliar, onde a infecção é assegurada pelo contato entre os mamíferos e vetores silvestres e sinantrópicos com os domésticos e domiciliados, inclusive o homem (Barretto 1979).

O estudo dos triatomíneos silvestres possibilita o conhecimento dos seus ecótopos naturais, sua associação com hospedeiros vertebrados, o mecanismo de interação entre o ecótopo artificial e natural, viabilizando também o esclarecimento dos principais mecanismos da transmissão de *T. cruzi* dos focos naturais para os ecótopos artificiais, e do eventual estabelecimento ou restabelecimento do ciclo doméstico de transmissão, o que têm contribuído para o estudo da dinâmica populacional desses insetos e da epidemiologia da doença de Chagas.

Nos municípios avaliados neste trabalho, chama à atenção a quantidade de ninfas infectadas com *T. cruzi* encontradas nos municípios de Rio Grandes do Sul, indicando a manutenção do ciclo silvestre da doença de Chagas. Entretanto, na maioria dos municípios estudados, percebe-se a proximidade das unidades domiciliares em relação ao ambiente silvestre, onde em muitos casos houve dificuldade de estabelecer se o trabalho estava sendo realizado em ambiente silvestre ou no peridomicílio. Aliado a esta característica está à presença de animais domésticos nestas áreas, confirmada pelas fontes alimentares detectadas no conteúdo estomacal dos triatomíneos, reforçando a idéia de que poderíamos tratá-las como um peridomicílio. Esta observação foi feita inicialmente por Almeida et al. (2002) ao realizar coletas nos municípios de Santana do

Livramento, Santiago, Canguçu e Encruzilhada do Sul, denominando então este aspecto do ambiente de “ruderal”.

No passado, a área endêmica ou, mais precisamente, com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no país, conhecida no final dos anos 70, incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos e destes 711 com presença do *T. infestans*, principal vetor estritamente domiciliar no Brasil (Ministério da Saúde 2015). Dias (1997) e Silveira & Rezende (1994) mencionaram que a maior prevalência da infecção por *T. cruzi* foi encontrado nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Goiás e Bahia.

Em 1975, ocorreu a estruturação do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), no âmbito nacional, por ação da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM). Em 1992, o Rio Grande do Sul passou a integrar o Plano de Eliminação de *Triatoma infestans* (PETI) e por meio desse programa foi possível conseguir um controle efetivo do principal vetor, o *T. infestans*, embora a região noroeste deste estado, na década dos 2000s ainda mantenhina alguns focos residuais no peridomicílio, por isso a Secretaria Estadual de Saúde/RS reforçava a necessidade da manutenção do estado de vigilância epidemiológica contínua e permanente (Dias 2007).

Recentemente, nossos resultados mostraram que no município de Santa Rosa no estado do Rio Grande do Sul, através da ação dos técnicos da vigilância entomológica verificou-se a presença de infestação com *T. infestans* infectados com *T. cruzi*. Este achado reforça a importância da vigilância epidemiológica na área.

5.1. Taxa de infecção com *T. cruzi* nos triatomíneos

A determinação da taxa de infecção pelo *T. cruzi* nos vetores coletados em regiões do Brasil com diferentes índices de endemicidade é relevante para o melhor conhecimento acerca da epidemiologia da doença de Chagas, para vigilância epidemiológica, assim como para elaboração de programas de controle da disseminação da doença. Para detecção da infecção por *T. cruzi* nos triatomíneos, o método mais utilizado é o exame microscópico do conteúdo intestinal, ou do aparelho digestivo dissecado. Contudo, o método apresenta algumas limitações, tais como: baixa sensibilidade, baixa reprodutibilidade, dificuldade de exame nos diferentes estágios evolutivos dos insetos vetores, necessidade da análise em insetos frescos, além da microscopia ser um procedimento extremamente laborioso e demorado. Nos países

endêmicos, muitas vezes, os insetos são coletados por agentes de saúde em comunidades rurais bastante isoladas, até estes espécimes chegarem a um laboratório para análise, muitas vezes, os triatomíneos já estão mortos, o que inviabiliza o exame microscópico. Em adição, este método varia em sua sensibilidade de observador. Finalmente, a análise da infecção em ninfas pequenas é ignorada, devido à dificuldade de processamento do material. Nesse contexto, a utilização da PCR no diagnóstico de *T. cruzi* apresenta várias vantagens, como maior sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade, além da possibilidade de uma identificação mais precisa nos diferentes subgrupos do parasito, dependendo dos iniciadores e sondas empregados.

Nossos resultados revelaram a presença de *T. cruzi* em dos exemplares de *T. infestans*. Em nenhum exemplar de *T. carcavalloii*, *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* analisado através da microscopia ótica foi detectado tripanosomatídeos. Entretanto ao analisar estas espécies através da abordagem molecular, detectou-se infecção, indicando a maior sensibilidade da técnica molecular. A PCR multiplex utilizada teve como base o protocolo sugerido por Britto (1993) que emprega iniciadores 121/122 para o alvo kDNA de *T. cruzi*, com fragmento de 330pb (regiões variáveis dos minicírculos do kDNA), que vem sendo utilizados há duas décadas para diagnóstico e acompanhamento de pacientes chagásicos a partir de amostras de sangue. A padronização desta técnica foi estabelecida anteriormente pelo LABIMDOE.

5.2. Identificação da fonte alimentar

A identificação de fontes alimentares de insetos vetores é de fundamental importância para o esclarecimento da transmissão de doenças entre os animais e o homem, além de auxiliar na compreensão da biologia destes insetos. Utilizando métodos de observação no campo, nem sempre é possível ter-se a noção exata desta biologia, visto que muitas vezes não é observado o ecletismo de determinadas espécies desta forma. Em virtude das várias limitações que a observação no campo impõe, é interessante a captura destes insetos e a coleta de material originário de tubo digestivo para a realização de análises laboratoriais que oferecem resultados mais precisos.

Desde a década de 1980, o teste imunoenzimático Enzyme-linked immunosorbent assay, conhecido pela sigla ELISA, vem sendo utilizado para identificação de fontes alimentares de insetos hematófagos (Burkot et al. 1981). Este método veio substituir o tradicional teste de precipitina em função de conferir vantagens, dentre as quais se destacam: sensibilidade superior, o que permite a utilização de pequenas quantidades de

amostra e maior diluição podendo assim ser realizadas várias análises a partir do mesmo material e atender pré-requisitos éticos com pesquisa em animais, uma vez que minimiza os riscos e desconfortos decorrentes da coleta do material biológico. O volume de antissoro necessário para análise neste teste, é cerca de 2.000 vezes menor do que o utilizado no teste de precipitina. Isto evita o sacrifício de centenas de animais de experimentação reduzindo a exposição e os danos eventuais aos animais.

O ELISA, foi padronizado para análises de fonte alimentar por Burkot et al. (1982), e desde então vem sendo utilizado para estudos de biologia de triatomíneos (Sandoval et al. 2004, Brito et al. 2008), mosquitos (Gomes et al. 2001, Zinser et al. 2004) e flebotomíneos (Ngumbi et al. 1992, Marassá et al. 2006). A eficiência do teste é descrita por Duarte (1997) em estudos com *Panstrongylus megistus* que registraram valores de sensibilidade de 96% e especificidade que pode variar entre 80 e 90%. Gomes et al. (2001), realizando estudo comparativo entre o ELISA e a técnica de precipitina para a detecção de fontes alimentares de mosquitos alimentados em gatos, cães e humanos, observou maior especificidade para a precipitação, enquanto o ELISA demonstrou ter maior sensibilidade. Segundo Lombardi & Espósito (1983), este teste apresenta capacidade para detectar a fonte alimentar de moscas 20 horas após o repasto sanguíneo em 100% dos casos.

Durante a realização do teste de ELISA, são empregados vários antissoros obtidos de animais diversas famílias de mamíferos como canídeos, eqüídeos, felídeos, bovídeos, didelfídeos, dasipodídeos assim como da ordem dos roedores e da classe das aves os quais são submetidos à reação com as amostras-teste, proveniente do tubo digestivo do inseto, afim de que os anticorpos presentes neste anti-soro reconheçam proteínas do sangue do hospedeiro no qual o inseto se alimentou. Dessa forma, o método tem possibilidades de identificar preferências alimentares particulares e distinguir o comportamento de espécies de insetos de importância médica-humana-veterinária que co-habitam regiões, como por exemplo: *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* e *T. circummaculata*, vetores da Doença de Chagas que circulam em áreas endêmicas no Rio Grande do Sul, mas que entretanto podem apresentar preferências alimentares distintas podendo portanto terem diferentes status epidemiológico na transmissão e manutenção do ciclo da doença de Chagas nesta área.

Neste estudo foram analisadas amostras de *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* e *T. circummaculata* provenientes de seis municípios com características geográficas semelhantes.

Os insetos foram capturados em seu ambiente natural em períodos sazonais distintos. Na primeira coleta, realizada em janeiro/2016, o número de insetos foi menor e a amostra obtida apresentava uma série de limitações devido ao prolongado jejum dos insetos e ao método aplicado para obtenção das mesmas, a compressão abdominal. Esta forma de coleta nos limitou ao material da porção final do intestino. Observou-se um índice de negatividade muito elevado 55,5 %, o que não é característico da metodologia de análise adotada. O teste ELISA, é reconhecido pela sua elevada sensibilidade e acredita-se que os índices de negatividade observados sejam derivados da baixa qualidade e quantidade da amostra utilizada. Recentemente, também têm sido utilizadas técnicas moleculares para a detecção de fontes alimentares em triatomíneos (Valença-Barbosa et al. 2015).

As amostras reativas indicaram que os triatomíneos capturados alimentaram-se principalmente com sangue de ovelhas. Os ovinos são observados em grande quantidade nas localidades estudadas, e apesar de permanecerem a maior parte do tempo soltos em grandes pastos, observou-se que durante a noite, estes animais têm o hábito de agruparem-se e dormirem próximo a afloramentos rochosos. Desta forma, cria-se a oportunidade para que os triatomíneos alimentem-se mantendo ativo o ciclo deste inseto na região, com os ovinos adquirindo importância epidemiológica considerável na manutenção da população de triatomíneos. Além disso, mesmo em locais de coleta onde a presença dos ovinos não era observada durante os períodos de captura, sinais da permanência destes animais como, fezes, pêlos e pegadas indicavam a possibilidade de sua presença constante naqueles locais.

Na segunda etapa de coletas nos municípios estudados, a quantidade de triatomíneos capturada foi cinco vezes maior, e o aumento do número relativo de amostras reativas para alguma das fontes alimentares testadas também. Entre os 225 insetos analisados, 81,7% foram reativas para uma ou mais fontes testadas. Este resultado sugere que a mudança na metodologia de obtenção das amostras foi fundamental para elevação do nível de sensibilidade do método.

Por outro lado, observou-se uma grande mudança no perfil de alimentação dos insetos. O sangue de aves foi a fonte alimentar mais frequente nesta etapa, que foi realizada em período sazonal mais frio e chuvoso. Observou-se também que a presença dos ovinos no ambiente era menos comum. Possivelmente em função das baixas temperaturas, estes animais encontravam-se mais confinados e protegidos do frio e da

chuva, não estando assim disponíveis para atuarem como fonte de alimento destas espécies de triatomíneos que tem nas rochas o seu habitat de preferência.

Estes resultados sugerem que os triatomíneos estudados apresentam grande capacidade de adaptarem-se ao ambiente e alimentam-se facilmente do sangue do hospedeiro que esteja disponível em cada período. Este tipo de comportamento é classificado por Garret-Jones et al. (1980), como passivo ou oportunista. Este autor avalia que o comportamento de um inseto tem relação direta com a sua importância na disseminação de patógenos e a sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes incluindo o domicílio e seus anexos.

De maneira semelhante ao observado na primeira coleta, os insetos aparentavam atravessar grandes períodos de jejum. Este fato pode ser comprovado pela pequena quantidade de sangue ingerido, observado no tubo digestivo durante o processo de dissecação para coleta das amostras. Mesmo nesta condição, foi possível identificar que 15 insetos alimentaram-se em múltiplas fontes, sendo a combinação ave/ovelha observada em 4 destes e um dado curioso foi a combinação ave/humano, no município de Lavras do Sul, embora em baixa frequência, isto revela a importância de uma vigilância epidemiológica nos municípios estudados. Observou-se também que embora as aves tenham sido o hospedeiro mais frequente, seguido dos ovinos, outros animais apareceram como fonte de alimento. Na maioria das vezes em combinação com os hospedeiros já citados, répteis, tatus e gambás também atuam como fonte de alimento.

Deve-se chamar a atenção para o fato de que entre os 225 insetos coletados, pode-se identificar alguma fonte de alimento em 184. Destes, 100% eram ninfas de diferentes estágios. Esta observação confirma o oportunismo das espécies que permanece sob as rochas e alimentam-se do hospedeiro que estiver disponível. Observa-se também o ecletismo alimentar, já que estas espécies de triatomíneos foram capazes de alimentar-se em aves, ovinos, marsupiais, répteis e edentados.

5.3. Biologia

De acordo com Oscherov et al. (2005) é essencial o conhecimento das características biológicas dos insetos para designar as estratégias de controle, principalmente nos vetores secundários com potencial para estabelecer em habitações humanas.

A importância de se estudar parâmetros bionômicos sobre os triatomíneos em condição de laboratório vem sendo destacada por diversos autores, seja para aumentar o conceito biológico de espécie, ou para melhorar as condições de criação em laboratório de diferentes vetores, independentemente de serem espécies de importância epidemiológica ou silvestre além de fornecer subsídios para os trabalhos de controle (Rocha et al. 1994, Galvão et al. 1996, Costa & Marchon-Silva 1998, Rodrigues et al. 2005).

Em condições de laboratório, onde fatores abióticos são mais estáveis e alimentação regular, ciclos vitais são geralmente mais curtos (Silva 1985). No entanto, certas espécies podem apresentar um ciclo de vida maior, devido a diapausa de ninfas de 5º estágio, observada em algumas espécies silvestres (Lent & Wygodzinsky 1979) como foi observado neste estudo em que as ninfas requerem várias refeições sanguíneas para realizarem a muda, que alonga esta fase até mais de um ano. O mesmo foi observado para *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* e *T. circummaculata* (Ruas-Neto 2002).

No primeiro estudo sobre o ciclo biológico de *T. carcavalloii* em condições de laboratório foi usada uma alimentação em pombos, baratas e lagartos (Ruas-Neto et al. 2001) Outros autores estudaram o ciclo biológico de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* alimentados com hemolinfa de Blattodea (baratas), para avaliar o desenvolvimento ninfal (Lorosa et al. 2000a). Este estudo sugere que este tipo de alimento pode ser um processo natural para essas espécies de triatomíneos, e provavelmente representa uma forma de sobreviver em condições naturais. Dependência de hemolinfa é muito evidente em *T. circummaculata*, como eles não se desenvolvem no laboratório como ninfa de primeiro estágio (N1) se este tipo de alimento não estiver disponível (Ruas-Neto & Corseuil 2002, Martins et al. 2006). Algumas espécies de triatomíneos possuem hábitos alimentares bastante ecléticos em condições naturais (Lorosa et al. 2000b).

O ciclo de vida de *T. infestans* (Perlowagora-Szumlewicz 1969) e a resistência ao jejum de *R. prolixus* (Feliciangeli et al. 1980) ambos trabalhos os autores estimaram que a refeição sanguínea representa uma condição essencial para oviposição em geral e fertilidade, em particular. Em *T. rubrovaria* não foi possível avaliar se a baixa eclosão é devido a esse fator, porque os espécimes utilizados nos experimentos foram alimentados uma vez por semana durante uma hora, sem estabelecer o nível de sangue ingerido por cada indivíduo (Argüello et al. 1988). Já em nossos estudos, a alimentação foi padronizada, *T. carcavalloii* foi alimentado com camundongos uma vez por semana até a repleção, por isso não podemos dizer que a baixa eclosão é devido à alimentação ou

outros fatores, tais como pequenas variações de temperatura e umidade durante o experimento.

A incidência de eclosão dos ovos varia entre espécies do gênero *Triatoma*, e mesmo dentro de uma mesma espécie. Em *T. carcavalloei*, a taxa de eclosão foi 38,3%, considerada baixa quando comparada com outras espécies de triatomíneos como *T. flavida*, que apresentou 93% dos ovos eclodidos (Cabello & Lizano 2001), *T. pseudomaculata* onde a taxa foi de 88,3% (Gonçalves et al. 1997) e um intervalo de 60 a 80% para *T. rubrovaria* (Damborsky et al. 2005), *T. dimidiata* (Zeledón et al. 1970), *T. infestans* (Rabinovich 1972), *T. maculata* (Feliciangeli et al. 1985), *T. rubrofasciata* (Braga et al. 1998) e *T. pallidipennis* (Martínez-Ibarra & Kathain-Duchateau 1999). No caso do gênero *Rhodnius* a temperatura foi observada e influencia não apenas no período de incubação, mas também na incidência de eclosão dos ovos, como mostrado por *R. robustus* (Rocha et al. 2001).

A média do período de incubação dos ovos em *T. rubrovaria* foi 24,84 dias (Argüello et al. 1998), já em nossos estudos o período de incubação para *T. carcavalloei* foi 22,7 dias.

Neste estudo, a busca para a primeira refeição das ninfas de *T. carcavalloei* resultou em maior frequência nos dias 2 e 4, semelhantes aos resultados de *T. pseudomaculata* (Gonçalves et al. 1997) e diferentes para *T. vitticeps* o que mostra uma preferência pelos 3º, 6º e 10º dias (Cortéz & Gonçalves 1998).

É importante cuidar dos triatomíneos recém alimentados, porque o manuseio inadequado é a principal causa de mortalidade em uma criação (Silva 1985, Gomes & Silva 2000).

O ciclo de *T. carcavalloei* precisa de um número médio de 13,4 refeições sanguíneas, maior que o observado para *T. rubrovaria* - 11,1 (Almeida et al. 2000), por *T. vitticeps* - 8 (Gonçalves et al. 1988) e para *T. brasiliensis* - 11 (Soares et al. 2000) e menor que *T. pseudomaculata* - 14,7 (Gonçalves et al. 1997). Devemos considerar que essas espécies vivem em habitats diferentes e com diferentes hábitos alimentares. Fêmeas de *T. pseudomaculata* para compensar a menor quantidade de sangue ingerido, procurou a fonte de alimento em um curto espaço de tempo, e executou um número maior de refeições sanguíneas (Gonçalves et al. 1997). Já ninfas de 5º estágio de *T. carcavalloei* realizam várias refeições antes de realizar a ecdise.

A média do período intermuda de ninfas de segundo estágio (N2) de *T. rubrovaria* foi maior do que para as ninfas de terceiro estágio (N3) (Almeida et al.

2000). Em *T. brasiliensis*, em condições de temperatura padrão, tendem a mostrar uma escala crescente de períodos intermuda de N1 a N5 (Silva 1985, Costa et al. 1998), corroborando com nossos estudos.

O período de resistência ao jejum para *T. carcavalloi* aumentou a partir do 1º ao 5º estágio ninfal. Durante a fase adulta, machos exibiram menor resistência em comparação com as fêmeas, corroborando os dados obtidos com uma temperatura de 30°C para *T. rubrovaria* (Silva 1985) e para *T. sordida* (Juarez & Silva 1982). Estes resultados não estão em consonância com os obtidos em *T. vitticeps* (Gonçalves et al. 1989) e *T. rubrovaria* (Almeida et al. 2003), que demonstraram maior resistência ao jejum em machos. Ninfas toleraram períodos de jejum maior do que adultos (Lent & Wygodzinsky 1979) confirmando nossos estudos. Entretanto, esta menor resistência dos adultos pode ser compensada pela maior capacidade de dispersão (Feliciangeli et al. 1980).

A eficácia das campanhas de controle de vetores tem sido prejudicada pela resistência ao jejum (Gonçalves et al. 1989), pois permite que esses animais permaneçam em seus abrigos, livre de inseticidas e às vezes até mesmo de seus efeitos residuais, aumentando assim a possibilidade de nova colonização pelos indivíduos restantes (Dias 1965, Costa & Perondini 1973, Galvão et al. 1996, Cortéz & Gonçalves 1998, Cabello 2001, Almeida et al. 2003, Cailleaux et al. 2011).

A taxa de mortalidade foi mais alta em ninfas de terceiro estágio de *T. rubrovaria* (Oscherov et al. 2005), corroborando os nossos estudos em que a taxa foi de 22,2%. Ninfas de *T. infestans* quando alimentadas em intervalos mais longos a taxa de mortalidade aumentou, comprovando a influência da alimentação sobre a mortalidade ninfal (Perlowagora-Szumlewicz 1953, 1969). Nossos resultados para longevidade constataram que os machos sobrevivem mais que as fêmeas corroborando os resultados obtidos para *T. rubrovaria* (Rodrigues et al. 2005, Silva 1985, Di Primio 1953, Argüello et al. 1998, Damborsky et al. 2005, Oscherov et al. 2005) e *T. rubrofasciata* (Braga et al. 1998). A longevidade da fêmea de *T. carcavalloi* foi maior quando alimentada com pombos, sugerindo uma provável influência da fonte de alimentação (Ruas-Neto 2002).

O ciclo de desenvolvimento das ninfas de quinto estágio de *T. carcavalloi* alimentados em pombos foi em média 259,67 dias (Ruas-Neto 2002), diferentes do nosso trabalho em que os insetos foram alimentados em camundongos e a média foi de 193,43 dias. O ciclo total de vida em *T. rubrovaria* foi 300 dias (Damborsky et al. 2005), já em nossos estudos, o ciclo foi maior em *T. carcavalloi*, 503,4 dias.

A influência da temperatura (25°C e 30°C) em *T. rubrovaria* foi também estudada e observou um desenvolvimento mais rápido em 30°C (Silva 1985). No presente estudo, as temperaturas iguais ou superiores a 28°C, também influenciaram o desenvolvimento de *T. carcavalloi*, encurtando o seu ciclo de vida.

Nossos resultados sugerem que características biológicas são critérios importantes para determinar a relação entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, coletados nos domicílios do Rio Grande do Sul, Brasil.

A capacidade de transmissão da doença de Chagas mostrada por *T. carcavalloi* é tão elevada quanto a de *T. rubrovaria*, enquanto *T. circummaculata* se infecta menos. Provavelmente, isso ocorre devido ao fato de *T. circummaculata* se alimentar com menos frequência em mamíferos. Estes dados, juntamente com os resultados deste estudo mostram a necessidade de vigilância epidemiológica constante de *T. carcavalloi*.

5.4. Atividades de Educação em Saúde

A implementação de políticas educativas relacionadas à sensibilização e capacitação em temáticas prioritárias de saúde pública constitui-se em um importante instrumento para progresso social e econômico de um país, garantindo o bem-estar e melhorias na qualidade de vida de sua população. Apesar do bem sucedido programa de controle de transmissão vetorial e transfusional adotado na década de 70 por países que integram o chamado cone sul, a doença de Chagas permanece um atual desafio devido as suas peculiares características epidemiológicas (Schofield et al., 2006). Assim, é importante destacar não somente o papel estratégico do poder público na manutenção de políticas de controle da doença de Chagas, mas também o potencial apoio por parte de outras iniciativas privadas e mesmo por entidades internacionais.

A educação é uma importante ferramenta para garantia de sucesso em programas de prevenção e erradicação de doenças. Com relação à doença de Chagas, entende-se que programas educacionais não formais (capacitação de agentes de saúde, guardas de endemias e laboratoristas vinculados ao Sistema único de Saúde) e formais (escolas públicas e privadas) associados a conscientização da população quanto à importância de um estado de vigilância para o inseto vetor, representam instrumentos para a manutenção de políticas institucionais de controle da doença, como preconizado pelo Consenso de Chagas (Ministério da Saúde - SVS, 2005).

Segundo Uchôa e Vidal (1994), as noções de saúde e doença, embora aparentemente simples, revelam fenômenos complexos que incluem fatores biológicos,

sociológicos, econômicos, ambientais e culturais, os quais transparecem nos múltiplos discursos e diferentes práticas de intervenção e pesquisa sobre a saúde.

A aplicação de questionários para a população trata-se de uma abordagem qualitativa que visa evidenciar o que as pessoas sabem sobre o triatomíneo e a doença de Chagas em uma tentativa de, respeitando os saberes existentes, conhecer aspectos e tendências gerais destes entrevistados em seu próprio ambiente natural, neste caso sua própria residência (Lüdke e André 1986; Minayo 1996).

Desde 1989, nosso grupo vem desenvolvendo estudos de campo em diferentes localidades com projetos relacionados a aspectos da eco-biologia de vetores e parasitos da doença de Chagas. No decorrer deste trabalho, identificou-se a necessidade de agregar ações educativas, visando contribuir para o fortalecimento de uma vigilância entomológica em áreas onde há a incidência de triatomíneos. Desde então, o grupo vêm atuando, em vários municípios brasileiros, em ações educativas formais e não formais através de cursos de Capacitação (Agentes de Saúde, Agentes Comunitários, Laboratoristas e docentes – nível médio e fundamental) além de programas de sensibilização de alunos e membros da comunidade (Gonçalves, 2000; Gonçalves et al., 2010; Sousa, 2016; Ricardo-Silva, 2017). Denominamos esta ação como “Olho Vivo no barbeiro” utilizando como ferramentas metodológicas apostilas, folders, e outros materiais educativos (mostruário do ciclo de vida do triatomíneo com conteúdos diferenciados para atender aos diferentes segmentos alvo profissionais, professores, alunos e comunidade), onde nossa equipe participa com a camiseta do projeto em todos os estados onde realizamos o trabalho. Estes materiais foram usados com sucesso nos municípios de Caçapava do Sul, Cachoeira do Sul, Canguçu, Encruzilhada do Sul, Lavras do Sul, tanto para população quanto para os funcionários da área de saúde. Um curso de capacitação estava programado para a rede de laboratoristas do estado, entretanto este foi cancelado pela Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Rio Grande do Sul, sob a alegação de que no momento não havia verba para subsidiar a vinda dos funcionários para um pólo onde seria ministrado o curso, ficando este, para ser realizado em outro momento futuro.

6.0. CONCLUSÕES

- A presença das espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* nos 7 municípios estudados é confirmada em áreas silvestres. Entretanto, a proximidade destas com o domicílio, gerou controversias acerca do limite geográfico entre silvestre e peridomicílio. Neste caso, seria possível incorporar a classificação dada por outros autores como um ecótopo ruderal, no qual se torna necessária a manutenção da vigilância epidemiológica na área.
- A análise das fontes alimentares mediante o teste ELISA, através do uso do conteúdo intestinal apresentou resultados mais precisos do que a realizada com as fezes dos insetos. A detecção de sangue de humanos, apesar de ser em baixa frequência, revela a importância epidemiológica e a necessidade de continuar com estudos na região.
- Foram encontrados triatomíneos infectados nos municípios de Caçapava do Sul, Canguçu, Lavras do Sul, Santa Rosa e São Jerônimo. A taxa total de infecção natural por *T. cruzi* mais alta foi encontrada em *T. rubrovaria*, entretanto a presença de infecção em exemplares de *T. infestans* aponta para o incremento da vigilância entomológica para esta espécie. O diagnóstico molecular foi mais sensível do que o método clássico de exame microscópico pelas fezes de triatomíneos.
- Baseado nas análises morfométricas, evidenciou-se dimorfismo sexual em *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*; as variáveis morfométricas que apresentaram maior variabilidade entre as espécies foram o comprimento total do corpo (CTC), largura abdominal (LA), ante-clípeo (AC), comprimento do pronoto (CP) e largura do pronoto (LP).
- Ao analisar os aspectos relacionados à biologia de *T. carcavalloi* podemos sugerir que a espécie não possui o mesmo sucesso adaptativo de *T. rubrovaria* uma vez que observamos que ninfas de quinto estágio (N5) precisam de vários repastos sangüíneos para efetuar a ecdise e se tornar um inseto adulto, o que ocorre com mais de um ano; que o ciclo total de desenvolvimento é maior que as outras espécies estudadas e que o percentual de ovos férteis é menor que *T. rubrovaria*, espécie encontrada na mesma região.

- As pessoas entrevistadas em sua maioria reconhecia um triatomíneo adulto, mas não reconhecia uma ninfa. Em relação à transmissão da doença de Chagas mais de 60% não tinha conhecimento. A situação foi revertida depois da implementação das atividades educativas e divulgação. Desta forma, acredita-se que estas atividades foram relevantes e contribuíram para melhorar o conhecimento da população.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gürtler RE. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108 (2): 251-254.

Almeida CE, Vinhaes MC, Almeida JR, Silveira AC, Costa J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95: 761-768.

Almeida CE, Duarte R, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002a; 97: 1127-1131.

Almeida CE, Pacheco RS, Noireau F, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002b; 97: 829-834.

Almeida CE, Francischetti CN, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003; 98: 367-371.

Almeida CE, Folly-Ramos E, Agapito-Souza R, Magno-Esperança G, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera- Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 231-235.

Anez N, Valenta DT, Carsola D, Quicke DJ, Feliciangeli MD. Multivariate analysis discriminate species of Phlebotominae sand flies (Diptera; Psychodidae), *Lutzomyia townsendi*, *L. spinicrassa* and *L. young*. J Med Entomol. 1997; 34: 312-316.

Argolo AM, Félix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz (PIDC). 2008; 67p.

Argüello NV, Mischis CC, Civitta G, Bonino EE. Ciclo biológico de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Reduviidae, Triatominae) en laboratorio. Rev Bras Zool. 1988; 5(2): 245-251.

Bar ME, Milano AMF, Damborsky MP, Oscherov EB, Avalos G. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. Rev Soc Entomol Argentina. 2003; 63: 107-113.

Avila HA, 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(2): 211-221.

Avila-Pires FD. Ecology of small mammals in relation to sylvan and domestic transmission cycles. Pan American Sanit Bureau. 1976; 317 (318): 301-06.

Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores naturais do *Trypanosoma cruzi*. Contribuição para o estudo dos focos naturais da Tripanosomose Americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1967; 1: 23-35.

Barretto MP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade Z (Eds). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 89-151.

Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil - Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. 2015; 46 - nº 21. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>

Braga MV, Pinto ZT, Lima MM. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 539-542.

Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2003; 2: 173-183.

Brito CM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2008; 103: 1111-1117.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88: 171-172.

Burkot TR, Goodman WG, Defoliart GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Hyg.* 1981; 30: 1336-1341.

Duarte R. Ensaio Imunoenzimático ELISA para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae), Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRZ. 1997; 103p.

Burkot TR, DeFoliart GR. Bloodmeal sources of *Aedes triseriatus* and *Aedes vexans* in a southern Wisconsin forest endemic for La Crosse encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31: 376-381.

Burkot TR, Goodman WG, DeFoliart GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30: 1336-1341.

Cabello DR. Resistance to Starvation of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under Experimental Conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 (4): 587-591.

Cabello DR, Lizano E. Biology of *Triatoma flavida* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae) under Laboratory Conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (6): 879-881.

Cailleaux SRP, Cunha V, Verly S, Junior VDL, Jurberg J. Resistência ao jejum de *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de laboratório. Rev Pan-Amaz Saúde. 2011; 2 (2): 39-43.

Cardozo-de-Almeida MAR. Estudos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais em cinco espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae) incluindo a biologia de *Triatoma carcavalloii*. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ. 2007.

Cardozo-de-Almeida M, Castro-de-Souza S, Oliveira MLR, Almeida SAS, Gonçalves TCM, Santos-Mallet JR. Ultrastructure and morphometry of eggs of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 and *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). Zootaxa. 2013; 3750 (4): 348-356.

Cardozo-de-Almeida M, Neves SCT, De Almeida CE, De Lima NRC, Oliveira MLR, Dos Santos-Mallet JR, et al.. Biology of *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 under laboratory conditions. Rev Soc Bras Med Trop, 2014; 47(3): 307-312.

Cecere MC, Gürtler R, Canale D, Chuit R, Cohen J. The role of the peridomiciliary area in the elimination of *Triatoma infestans* from rural Argentine communities. Rev Panam Salud Publica. 1997; 1: 273-279.

Cecere MC, Vazquez-Prokopec G, Gürtler R, Kitron U. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1096-1102.

Correa RR. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no estado de São Paulo. Rev Bras Malariol Doen Trop. 1968; 20: 39-81.

Cortéz MGR, Gonçalves TCM. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93 (4): 549-554.

Costa MJ, Perondini ALP. Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. Rev Saúde Pub São Paulo. 1973; 7: 207-217.

Costa J, Marchon-Silva V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol y Vect. 1998; 5 (1): 23-34.

Costa J, Almeida CE, Dujardin JP, Beard CB. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003; 98: 637-639.

Coura JR, Ferreira LF, Rubens J, Pereira NC, Silva JR. Tripanossoma do "complexo cruzi" em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1966; 8: 125-133.

Damborsky MP, Bar ME, Gorla D. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) under constant and fluctuating conditions of temperature and humidity. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(5): 433-437.

Darwin CR. The Voyage of the Beagle. 1871. Disponível em: <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-voyage-of-the-beagle/index.html>

De Geer C. Mémoires pour servir à l'histoire des Insectes. V. Stockholm. 1773; 448 p.

De Souza W. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. *Kinetop Biol Dis.* 2002; 1: 3-24.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammals host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984; 79: 513-515.

Di Primio P. Sobre o *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) no Rio Grande do Sul. *Rev Medicina Rio Grande do Sul.* 1953; 402-408.

Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia. In: JCP Dias, JR Coura (eds), *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ. 1997; 33-65.

Dias JCP, Schofield CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31: 373-383.

Dias JCP. Controle da doença de Chagas. In: JCP Dias, JR Coura (eds), *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ. 1997; 453-468.

Dias JCP. Observações sobre o comportamento de triatomíneos brasileiros frente ao jejum, em laboratório. *Rev Bras Malariol D Trop.* 1965; 17: 55-63.

Dias JCP. Doenças de Chagas: sucessos e desafios. *Cad Saude Publica.* 2006; 22: 2020-2021.

Dias JCP. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad. Saude Publica* 2007; 23(1): 13-22.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease in Latin America – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97 (5): 603-612.

Dias JCP, Ramos Jr. NA, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, Torres RM, Melo JRDC, Almeida EAD, Oliveira Jr. WD, Silveira AC, Rezende JMD, Pinto FS, Ferreira AW, Rassi A, Filho AAF, Sousa ASD, Filho DC, Jansen AM, Andrade GMQ, Britto CFDPDC, Pinto AYDN, Rassi Jr. A, Campos DE, Abad-Franch F, Santos SE, Chiari E, Hasslocher-Moreno AM, Moreira EF, Marques DSDO, Silva EL, Marin-Neto JÁ, Galvão LMDC, Xavier SS, Valente SADS, Carvalho NB, Cardoso AV, Silva RAE, Costa VMD, Vivaldini SM, Oliveira SM, Valente VC, Lima MM, Alves RV. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol Serv Saúde*. 2016; 25(núm. esp.): 7-86.

Duarte R. Ensaio Imunoenzimático ELISA para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae), Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRZ. 1997.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales. 2000; 24: 162 p.

Dujardin JP, Chávez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F, Schofield CJ. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol*. 1999a; 36(6): 653-659.

Dujardin JP, Panzera P, Schofield CJ. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999b; 94 (Suppl. I): 223-228.

Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol*. 1997a; 34 (5): 544-51.

Dujardin JP, Bermudez H, Schofield CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop.* 1997b; 66 (3): 145-53.

Dujardin JP, Forgues G, Torrez M, Martinez E, Cordoba C, Gianella A. Morphometric of domestic *Panstrongylus rufoturbeculatus* in Bolivia. *Annals of Trop Med & Parasitol.* 1998; 92 (2): 219-228.

Feliciangeli D, Rabinovich J, Fernandez E. Resistencia al ayuno em triatomíneos (Hemíptera, Reduviidae) Venezolanos. I. *Rhodnius prolixus* Stal. *Rev Inst Trop São Paulo.* 1980; 22: 53-61.

Feliciangeli MD, Rabinovich J. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. II. *Triatoma maculata*. *J Med Entomol.* 1985; 22: 43-48.

Ferreira ILM, Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39 (5): 507-509.

Ferreira RTB, Branquinho MR, Leite PC. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. *Vig Sanit Debate.* 2014; 2 (04): 4-11.

Freire P. Educação como prática de liberdade. Rio de Janeiro: Paz e Terra. 1983; 14 ed: 46p.

Freire P. Pedagogia da Autonomia: saberes necessários à prática educativa. São Paulo: Paz e Terra, (Coleção Leitura). 1996; 30 ed: 148p.

Galvão C. A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol Vect.* 2003; 10: 511-530.

Galvão C, Jurberg J, Lent H. Resistência ao jejum de *Triatoma nitida* Usinger, 1939 em laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91 (5): 639-640.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa. 2003; 202: 1-36.

García BA, Moriyama EN, Powell JR. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. J Med Entomol. 2001; 38: 675-683.

Garrett-Jones C, Boreham PFL, Pant CP. Feeding habits of anophelines (Diptera: Culicidae) 1971-78, with reference to the human blood index: A review. Bull Entomol Research. 1980; 70: 165-85.

Gomes AB, Silva IG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XXI. *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Patol Trop. 2000; 29: 85-93.

Gomes LAM, Duarte R, Lima DC, Diniz BS, Serrão ML, Labarthe N. Comparison between Precipitin and ELISA Tests in the bloodmeal detection os *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes flaviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and humans hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 693-695.

Gonçalves TCM, Victorio VMN, Jurberg J, Cunha V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) I. Resistência ao jejum. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84 (1): 131-134.

Gonçalves TCM, Victorio VNM, Jurberg J, Cunha V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) I. Ciclo evolutivo. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988; 83: 519-523.

Gonçalves TCM, Cunha V, Oliveira E, Jurberg J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Côrrea & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92 (2): 275-280.

Gonçalves TCM. Aspectos ecológicos de *Triatoma vitticeps* (STAL, 1859) (Hemiptera, Reduviidae), com caracterização das amostras de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas desse triatomíneo, no município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p 1-126. 2000.

Gonçalves TCM ; Lopes CM; Santos-Mallet JR; Gomes ACF; Modena CM; Schall VT. Ações Integradas de Educação e Saúde na Prevenção da Doença de Chagas no Estado de Tocantins. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista, v. 43, p. 48-49, 2010.

Cortéz MGR, Gonçalves TCM. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93 (4): 549-554.

Gurevitz JM, Gaspé MS, Enriquez GF, Provecho YM, Kitron U, Gürtler RE. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7: e2158.

Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. J Trop Med. 2012; 2012: 1-15.

Gürtler RE. Control campaigns against *Triatoma infestans* in a rural community of northwestern Argentina. Medicina. 1999; 59: 47-54.

Hernández ML, Dujardin JP, Gorla DE, Catalá SS. Potential sources of *Triatoma infestans* reinfesting peridomiciles identified by morphological characterization in Los Llanos, La Rioja, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108: 91-97.

Hoare CA. Morphological and Taxonomic Studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. J Protozool. 1964; 11 (2): 200-207.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972; 750p.

Hotez PJ. Ten Global “Hotspots” for the Neglected Tropical Diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8 (5): e2496.

Hutcheson HJ, Olier JHJR, Houck MA, Stauss RE. Multivariate morphometric discrimination of nymphal and adult forms of the blacklegged tick (Acari-Ixodidae), a principal vector of Lyme disease in Aestern North America. J Med Entomol. 1995; 32: 827-843.

Jansen AM, Santos de Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (Suppl. I): 203-204.

Juarez E, Silva EPC. Comportamento do *Triatoma sordida* em condições de laboratório. Rev Saúde Públ. 1982; 16 (supl): 1-35.

Jurberg J, Rocha DS, Lorosa ES, Vinhaes M, Lent H. Uma nova espécie de *Triatoma* do estado do Rio Grande do Sul (Hemiptera, Reduviidae). Entomol y Vect. 1998; 5 (6); 295-310.

Jurberg J, Galvão C, Noireau F, Carcavallo RU, Rocha DS, Lent H. Uma Iconografia dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae). Entomol y Vect. 2004; 11 (1): 457-494.

Jurberg J, Cunha V, Cailleaux S, Raigorodski R, Lima MS, Rocha DS. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria*. Rev Pan-Amaz Saude. 2013; 4(1): 43-56.

Justi SA, Russo CAM, Mallet JRDS, Obara MT, Galvão C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors*. 2014; 7:149.

Justi SA, Galvão C, Schrago CG. Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10 (4): e0004527.

Lannes-Vieira J, Soeiro MNC, Corrêa-Oliveira R, Araújo-Jorge TC. Chagas disease centennial anniversary celebration: historical overview and prospective proposals aiming to maintain vector control and improve patient prognosis - a permanent challenge. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (Suppl. I): 5-7.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull American Mus Nat Hist*. 1979; 163: 125-520.

Lent H. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. *Rev F de Medicina*. 1942; 6: 3-13.

Lent H. Evolução dos Conhecimentos sobre Vetores da Doença de Chagas 90 Anos após sua Descoberta. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 (Suppl. I): 89-92.

Lenzi MF, Camillo-Coura L, Gault CE, Barros MV. Dengue in a Rio de Janeiro slum: a preliminary analysis. *Cad Saúde Pública*. 2000; 16 (3): 851-856.

Lombardi S, Esposito F. A new method for identification of the animal origin of mosquito bloodmeals by the immunobinding of peroxidase-anti-peroxidase complexes on nitrocellulose. *J Immunol Methods*. 1983; 86(1): 1-5.

Lorosa ES, Jurberg J, Souza ALA, Vinhaes MC, Nunes IM. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol y Vect*. 2000^a; 7 (3): 287-296.

Lorosa ES, Nunes IM, Vinhaes MC, Andrade RE, Jurberg J. Preferência alimentar de algumas espécies de Triatomíneos capturados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. *Entomol y Vect.* 2000b; 7 (2): 211-225.

Ludke M; André M. E. D. A. - Pesquisa em educação: abordagens qualitativas. São Paulo, E.P.U., 1986. 99p.

Macedo CL. Estudo do complexo *Triatoma sordida* (Stal, 1859) Hemiptera, Reduviidae, Triatominae através de marcadores genéticos, morfometria e morfologia. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ; 2001.

Marassá AM, Consales CA, Galati EAB, Nunes VLB. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39: 183-186.

Marin N, Jimenez GE, Benarroch A. Delimitacion de lo que el alumno sabe a partir de objetivo y modelos de enzeñanza. *Enzeñanza de las Ciências.* 1997; 15 (2): 215-224.

Martínez-Ibarra JA, Katthain-Duchateau G. Biology of *Triatoma pallidipennis* (Stål, 1872) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 (6): 837-840.

Martins LPA, Castanho REP, Casanova C, Caravela S DT, Frias GT, Ruas-Neto AL, Rosa JA. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39 (2): 198-202.

Meneguetti DUO, Trevisan O, Rosa RM, Camargo LMA. First report of *Eratyrus mucronatus*, Stål, 1859, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), in the State of Rondônia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44 (4): 511-512.

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 area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977; 71: 217-225.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* 2009; 136:1509 - 1528.

Minayo MCS. O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde. 4. ed. São Paulo, 1996. 269p.

Ministério da Saúde-SVS. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Vol. 38 (Suplemento III): 1-29, 2005.

Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/12-doenca-de-chagas/11116-situacao-epidemiologica-chagas>. (Acessado: Fevereiro de 2017)

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. O Brasil sem miséria / Organizadores: Tereza Campello, Tiago Falcão, Patricia Vieira da Costa. – Brasília: MDS. 2014; 848p.

Neiva A. Informações sobre a biologia da Vinchuca, *Triatoma infestans* Klug. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1913; 5 (1): 24-31.

Ngumbi PM, Lawyer PG, Johson RN, Kilu G, Asiago C. Identification by phlebotominae sandflies bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med Vet Entomol.* 1992; 6: 385-388.

Nobrega AA. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(4): 653-655.

Nota Técnica N.º 1/2011/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA. Embasamento técnico e sugestões para ações de controle das Doenças da Pobreza no Programa de Erradicação da Pobreza Extrema no Brasil. FIOCRUZ/IOC. Rio de Janeiro. 2011; p. 13.

PAHO. Chagas Disease. 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=pt (Acessado: Fevereiro de 2017)

Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano AMF. Estadísticos poblacionales de *Triatoma rubrovaria* en condiciones de laboratorio. Rev Saúde Pública. 2005; 39 (2): 211-216.

Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano AMF. Tablas de vida de fecundidad de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Heteroptera: Reduviidae) em condiciones experimentales. In: Jornadas de Comun. Cient. y Tecnol. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina, 2004.

Passos ADC, Silveira AC. Síntese dos resultados dos inquéritos nacionais. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44 (supl II): 47-50.

Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. Mol Biochem Parasitol. 2003; 129: 79-90.

Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJC. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiasis of hosts with Chagas' disease. 3. On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev Saúde Pública. 1988; 22: 390-400.

Perlowagora-Szumlewicz A. Estudos sobre a biologia do *Triatoma infestans*, o principal da doença de Chagas no Brasil (importância de algumas de suas características biológicas no planejamento de esquemas de combates a esse vetor). Rev Bras Malariol Doen Trop. 1969; 21: 117-159.

Perlowagora-Szumlewicz A. Ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* em condições de laboratório. Rev Bras Malar. 1953; 5: 35-47.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop. 2007; 103 (3): 195-200.

Rabinovich JE. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. J Med Ent. 1972; 9: 351-370.

Ricardo-Silva A. Abordagens ecológicas sobre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e ações de educação visando a prevenção da doença de Chagas no Estado de Roraima. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p 1-128. 2017.

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Presgrave OAF, Cunha V, Galvão C. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. Rev Saúde Pública. 2001; 35 (4): 400-406.

Rocha DS, Galvão C, Jurberg J. Biologia do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 265- 270.

Rodrigues VLCC, Filho ANF, Silva EOR. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843): tábua das ninfas, duração das formas e oviposição das fêmeas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38 (3): 251-254.

Rosa JA. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de 1º e de 5º estádios de *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1995.

Rosa JA, Barata JM, Santos JLF, Cilense M. Morfologia dos ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Rev Saúde Pública. 2000; 34 (5): 538-542.

Ruas-Neto AL. Aspectos morfológicos, distribuição geográfica, hábitos e importância vetorial de *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), triatomíneos rupestres do Rio Grande do Sul (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Tese de Doutorado. Rio Grande do Sul: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2002.

Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, Garcia BA. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*. 2004; 121: 229-40.

Ruas-Neto AL, Corseuil E, Cavalleri A. Development of rupestrian triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following hemolymphagy on blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Entomol y Vect*. 2001; 8 (2): 205-216.

Ruas-Neto AL, Corseuil E. Hábitos, Distribuição Geográfica e Potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Entomol y Vect*. 2002; 9 (2): 231- 249.

Salvatella R, Calegari L, Puime A, Basmadjian Y, Rosa R, Guerrero J, Martinez M, Mendaro G, Briano D, Montero C. Feeding pattern of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) in peridomiliary habitats, of a rural area of Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994; 36: 311-320.

Salvatella R, Rosa R, Basmadjian Y, Puime A, Calegari L, Guerrero J, Martinez M, Mendaro G, Briano D, Montero C, Wisnivesky-Colli C. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90: 325-328.

Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha DS, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (2): 37-140.

Santos CM, Jurberg J, Galvão C, Martínez M. Morfometria comparada de *Triatoma infestans*, *T. rubrovaria* e *T. platensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Uruguai. Iheringia. Série Zoologia. 2009; 99: 56-60.

Schofield CJ. Triatominae: Biology and Control. Eurocommunica Publ., Bognor Regis, UK. 1994; 80p.

Schofield CJ, Dolling WR. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: Lane, R.P, Crosskey, R.W. (Eds.), Medical Insects and Arachnids. Chapman and Hall, London, UK. 1994; 483-516p.

Schofield CJ; Diotaiuti L; Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (Suppl 1): 375-378.

Schofield CJ; Jannin J; Salvatella R. The future of Chagas Disease control. Trends Parasitology. 2006; 22(12): 533-538

Shikanai-Yasuda MA, Brisola CM, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JCP et al.. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 1991; 33 (5): 351-7.

Silva MBA, Jurberg J, Galvão C, Carcavallo RU. Estudo morfológico e morfométrico de ovos e ninfas de *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) vistos por microscopia óptica e eletrônica de varredura. Entomol y Vect. 2000; 7 (3): 311-334.

Silva IG, Silva HHG. Suscetibilidade de 11 espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) à cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Rev Bras Ent. 1993; 37: 459-463.

Silva IG. Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) e no xenodiagnóstico. Tese de doutorado. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1985.

Silveira AC, Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994; 27 (Supl III): 11-22.

Silveira AC, Arias AR, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H, Dias JCP, Valdes PJ, Lorca M, Salvatella R. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. Organização Panamericana de Saúde. 2002; 316p.

Soares RP, Evangelista LG, Laranja LS, Diotaiuti L. Population dynamics and feeding behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, main vectors of Chagas disease in Northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95: 151-155.

Sousa DM. Aspectos eco-epidemiológicos e áreas de vulnerabilidade da Doença de Chagas associadas a ações de educação em saúde na região do Cariri, Estado do Ceará. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 1-178. 2016.

Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2003; 33: 269-279.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol,* 1989; 33 (3): 205-214.

Tomazi L, Kawashita SY, Pereira PM, Zingales B, Briones MRS. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genet Mol Res.* 2009; 8: 458-476.

Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS Negl Trop Dis,* 2012; 6(12): e1958.

Valença-Barbosa C, Fernandes FA, Santos HL, Sarquis O, Harry M, Almeida CE, Lima MM. Molecular Identification of Food Sources in Triatomines in the Brazilian Northeast: Roles of Goats and Rodents in Chagas Disease Epidemiology. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 93(5):994-7.

Valente SAS. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. In: Exposição na mesa redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Florianópolis. 2005.

Valente SAS, Valente VC, Fraiha Neto H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 (Suppl. D): 395-398.

Valla VV. Educação popular, saúde comunitária e apoio social numa conjuntura de globalização. *Cad. Saúde Pública.* 1999; 15 (2): 7-14.

Wincker P, Britto C, Borges Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 199; 451: 771-777.

Zeledon R, Guardia VM, Zuniga A, Swartzwelder JC. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. *J Med Entomol.* 1970; 7: 313- 319.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 240-253.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (7): 1051-1054.

Zinser M, Ramberg F, Willott E. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. J Insect Sci. 2004; 4: 20.

9.0. APÊNDICES E/OU ANEXOS

ANEXO 1

Questionário complementar para avaliar o conhecimento da população sobre a doença de Chagas e o inseto vetor

Nome:	Idade:	
Reconhece o triatomíneo: <i>(mostrar a caixa com os exemplares)</i>	Adulto [] Ninfa []	
Já foi picado pelo barbeiro?	Sim []	Não []
Sabe que o barbeiro pode transmitir doença?	Sim []	Não []
Corhece alguém que tenha doença de Chagas?	Sim []	Não []
Você sabe como se pega a doença de Chagas?	Sim []	Não []
Qual (ou quais) o local de preferência do barbeiro dentro da casa?	Cozinha [] Dormitório [] Sala [] , atrás de quadros, móveis e roupas []	
Qual (ou quais) o local de preferência do barbeiro fora da casa?	Galinheiro [] curral [] chiqueiro [] paiol [] outro []	
Os barbeiros chupam sangue ?	Sim []	Não []
Os barbeiros chupam sangue de...	Pessoas [] Galinhas e outras aves [] Cachorros e outros mamíferos []	
Em caso afirmativo, já viu alguma foto desse parasita?		
Manipula caça?	Sim []	Não []

ANEXO 2



Laboratório Interdisciplinar de
vigilância Entomológica em Díptera e
Hemiptera Instituto Oswaldo Cruz –
FIOCRUZ

Pré teste:

- 1) Você conhece o inseto barbeiro? () sim () não
- 2) Que tipo de inseto é o barbeiro: () percevejo () besouro () barata
- 3) Quantos tipos de barbeiros você acha que existe? () um () dois () três () mais de 3
- 4) Você sabe onde o barbeiro vive? () sim () não Onde? _____
- 5) Ele transmite alguma doença? () sim () não Se sim, qual? _____
- 6) Você sabe o que o barbeiro pode transmitir? () protozoário () bactéria () vírus
- 7) Você sabe como o barbeiro transmite o patógeno?
() pela picada () pela fezes () ambos
- 8) Qual a sua cidade de origem? _____

Pós teste:

- 1) Você conhece o inseto barbeiro? () sim () não
 - 2) Que tipo de inseto é o barbeiro: () percevejo () besouro () barata
 - 3) Quantos tipos de barbeiros você acha que existe? () um () dois () três () mais de 3
 - 4) Você já encontrou algum inseto barbeiro? () sim () não Onde? _____
 - 5) Você sabe onde o barbeiro vive? () sim () não Onde? _____
 - 6) Ele transmite alguma doença? () sim () não Se sim, qual? _____
 - 7) Você sabe o que o barbeiro pode transmitir? () protozoário () bactéria () vírus
 - 8) Você sabe como o barbeiro transmite o patógeno?
() pela picada () pela fezes () ambos
 - 9) Você já encontrou algum inseto barbeiro? () sim () não Onde? _____
 - 10) As pessoas que vocês conhecem costumam comentar sobre a presença deste inseto em suas casas? () sim () não
 - 11) As pessoas que vocês conhecem já demonstraram interesse em obter esclarecimentos sobre este inseto? () sim () não
 - 12) Como você acha que poderia ajudar a prevenir esta doença?
-

