

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Cenário ecoepidemiológico da doença de Chagas no entorno do  
Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**

**por**

***Carlota Josefovicz Belisário***

**Belo Horizonte**

**Agosto/2012**

**TESE DBCM-CPqRR**

**C.J. BELISÁRIO**

**2012**

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Cenário ecoepidemiológico da doença de Chagas no entorno do  
Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**

*por*

***Carlota Josefovicz Belisário***

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de  
Doutor em Ciências na área de concentração Biologia  
Celular e Molecular

**Orientação: Dra. Liléia Diotaiuti**

Belo Horizonte

Agosto/2012

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

B431c  
2012

**Belisário, Carlota Josefovicz.**

Cenário ecoepidemiológico da doença de Chagas no entorno do Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil / Carlota Josefovicz Belisário. – Belo Horizonte, 2012.

XIX, 140 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 122 – 140

Anexos: 141 - 159

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

**1. Doença de Chagas/Prevenção e Controle 2. Trypanosoma cruzi/patogenicidade 3. Panstrogylus/parasitologia 4. Triatominae/parasitologia 5. Reservatórios de Doenças/parasitologia 6. Técnica de Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico/métodos 1. Título. II. Diotaiuti, Liléia (Orientação)**

CDD – 22. ed. – 616.936 3

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Cenário ecoepidemiológico da doença de Chagas no entorno do Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**

**por**

**Carlota Josefovicz Belisário**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dra. Liléia Diotaiuti (Presidente)**

**Prof. Dr. Jose Manuel Latorre Estivalis**

**Prof. Dra. Érika Carime Borges**

**Prof. Dr. Alexandre Silva de Paula**

**Suplente: Prof. Dra. Marcela Lencine Ferraz**

**Tese defendida e aprovada em: 08/08/2012**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Líléia Diotaiuti

Colaborações:

Dra. Roberta Lima Caldeira – CPqRR / FIOCRUZ

Ms. Jaqueline Serafim Nascimento – Secretaria Municipal de Saúde de Jaboticatubas

Ms. João Victor Leite Dias – CPqRR / FIOCRUZ e Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha

*Aos agentes de saúde de Jaboticatubas que,  
por acreditarem na importância do seu trabalho,  
o fazem tão bem e essencial.*

## Agradecimentos

À Liléia Diotaiuti por me confiar seu sonho de trabalhar em uma região tão especial, pelos ensinamentos e apoio incondicional em todos os momentos.

À Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais e Secretarias Municipais de Saúde de Jaboticatubas e Santana do Riacho por viabilizarem esse trabalho.

Aos agentes de saúde de Jaboticatubas: Luiz Antônio de Queiroz, Ronaldo Marques Santos, Giovani Roosevelt Martins, Silvano Rosa Gonçalves de Melo e em especial José da Piedade Gonçalves, por todo o suporte prestado nas capturas domiciliares e de campo.

Aos agentes de saúde de Santana do Riacho, pelas capturas domiciliares.

Aos amigos João Paulo, Ronaldo e Grasielle pelas várias capturas em campo que, mesmo com todas as dificuldades, carrapato, chuva, frio, cansaço, sempre estiveram dispostos sem nunca reclamar ou pensar em desistir. Sem vocês não seria possível.

À Jaqueline e João Victor pelas análises espaciais.

À Dra. Roberta Caldeira pela colaboração nos estudos envolvendo ITS-2.

Ao estagiário Henrique Vasconcellos Ávila que participou da caracterização molecular dos *T. cruzi* isolados de reservatórios.

Ao estudante de Iniciação Científica Alison Bramuth Costa que participou da análise morfométrica e de RAPD dos triatomíneos.

Aos colegas do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas: Ademilson, Aline, Cristiane, Elisa, Fernando, Inês, José Eloy, José Manuel, Juliana, Letícia, Luciana, Newmar, Raquel, Rita, Roberta, Sarah, Silvia e Thessa.

Às Dra. Marcela Ferraz e Dra. Roberta Caldeira pela avaliação e contribuições na ocasião da qualificação.

Ao Instituto Chico Mendes, em especial à Henri Dubois Collet e Kátia Torres Ribeiro por possibilitarem e apoiarem os estudos no Parque Nacional da Serra do Cipó.

Ao Higor, meu companheiro, pela compreensão de minhas ausências devido às muitas viagens de campo, pelo suporte nos momentos difíceis, pelo seu carinho e amor.

Aos meus pais, Ronaldo e Heloiza, e minha irmã, Tatiana, que apesar da angústia que esse longo processo de formação causou, nunca deixaram de me apoiar, incentivar e acreditar.



Ao CNPq pelo financiamento deste estudo (Edital Universal – processo nº 476352/2008-8) e pela bolsa de Doutorado.

## Sumário

Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Lista de abreviaturas	xvii
Resumo	xviii
Abstract	Xix
1 Introdução	20
1.1 A Doença de Chagas	21
1.2 O Controle Vetorial da Doença de Chagas no Brasil	23
1.3 Os Triatomíneos	27
1.4 Estudos Biossistemáticos em Triatomíneos	36
1.5 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
1.6 A Serra do Cipó	42
2 Objetivos	45
2.1 Objetivo Geral	46
2.2 Objetivos Específicos	46
3 Metodologia	48
3.1 Caracterização da Área de Estudo	49
3.2 Busca de Triatomíneos no Ambiente Artificial	50
3.3 Análise espacial	52
3.4 Busca de Triatomíneos no Ambiente Natural	54
3.5 Captura de Reservatórios Silvestres	59
3.6 Exames em Cães Domésticos	62
3.7 Xenodiagnóstico	65
3.8 Exame de triatomíneos	67

3.9	Caracterização dos triatomíneos capturados	67
3.9.1	Morfometria geométrica	67
3.9.2	Caracterização molecular	70
3.9.2.1	– Espaçador Transcrito Interno (ITS 2)	70
3.9.2.2	– Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente (RAPD)	71
3.10	Caracterização Molecular das Cepas de <i>T. cruzi</i>	74
4	Resultados	76
4.1	Perfil de Infestação das Unidades Domiciliares por <i>Panstrongylus megistus</i> no Município de Jaboticatubas	77
4.2	Análise espacial	80
4.3	Captura de Triatomíneos no Ambiente Artificial do Município de Santana do Riacho	81
4.4	Busca de Triatomíneos no Ambiente Silvestre dos Municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho	85
4.5	Reservatórios Silvestres	88
4.6	Reservatório Doméstico Cães	90
4.7	Caracterização dos Triatomíneos Capturados	92
4.7.1	Morfometria Geométrica	93
4.7.2	Espaçadores Transcritos Internos – ITS 2	95
4.7.3	Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente – RAPD	96
4.8	Caracterização Molecular das Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	100
5	Discussão	102
6	Conclusões	119
7	Referências Bibliográficas	122
8	Anexos	141

8.1	Licenças	142
8.2	Extração de DNA a partir de sangue de cães utilizando o kit de extração de DNA genômico Wizard (Promega)	146
8.3	Extração de DNA a partir de patas de triatomíneos utilizando o kit de extração de DNA genômico Wizard (Promega)	147
8.4	Dados de capturas de triatomíneos em unidades domiciliares de Jaboticatubas, Minas Gerais, no período de setembro/2007 a outubro/2010 e as populações utilizadas para o estudo de RAPD	148
8.5	Dados de capturas de triatomíneos em unidades domiciliares de Santana do Riacho, Minas Gerais, no período de setembro/2007 a outubro/2010	152
8.6	Sequências consenso de ITS 2 do rDNA de <i>Panstrongylus megistus</i>	154

## Lista de figuras

Figura 1	Distribuição mundial da doença de Chagas e estimacão da populacão global infectada pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> ( <a href="http://www.treatchagas.org">www.treatchagas.org</a> )	20
Figura 2	Mapa de risco da transmissão vetorial domiciliar da doença de Chagas ou de seu restabelecimento nos municípios brasileiros. 2006. (Silveira & Dias 2011)	24
Figura 3	Vista dorsal do <i>Panstrongylus megistus</i>	27
Figura 4	Distribuição e projeção da ocorrência de <i>Panstrongylus megistus</i> no Brasil. Ocorrências conhecidas são representadas em quadrados amarelos e a predição consenso final em áreas pretas. Áreas identificadas como adequadas de acordo com condições climáticas são mostradas em azul, e áreas identificadas como adequadas baseada no índice de diferença de vegetação normalizada (NDVI) são demonstradas em verde (Gurgel-Gonçalves <i>et al.</i> 2012)	28
Figura 5	Vista dorsal do <i>Triatoma sordida</i>	30
Figura 6	Distribuição e projeção da ocorrência de <i>Triatoma sordida</i> no Brasil. Ocorrências conhecidas são representadas em quadrados amarelos e a predição consenso final em áreas pretas. Áreas identificadas como adequadas de acordo com condições climáticas são mostradas em azul, e áreas identificadas como adequadas baseada no índice de diferença de vegetação normalizada (NDVI) são demonstradas em verde (Gurgel-Gonçalves <i>et al.</i> 2012)	31
Figura 7	Vista dorsal de <i>Rhodnius neglectus</i>	32
Figura 8	Distribuição e projeção da ocorrência de <i>Rhodnius neglectus</i> no Brasil. Ocorrências conhecidas são representadas em quadrados amarelos e a predição consenso final em áreas pretas. Áreas identificadas como adequadas de acordo com condições climáticas são mostradas em azul, e áreas identificadas como adequadas baseada no índice de diferença de vegetação normalizada (NDVI) são demonstradas em verde (Gurgel-Gonçalves <i>et al.</i> 2012)	33
Figura 9	1) Brasil, biomas, distribuição geográfica da Serra do Espinhaço e rios São Francisco, Doce e Jequitinhonha; 2) Os mesmos elementos em detalhe apresentando o Estado de Minas Gerais e localização do Parque Nacional da Serra do Cipó e Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira; 3) detalhe apresentando limites das duas unidades de conservação, limites dos municípios da região e seus principais rios (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / ICMBio 2009)	41
Figura 10	Armadilha de Noireau (Noireau <i>et al.</i> 2002)	55
Figura 11	Armadilha luminosa para atração de triatomíneos	56
Figura 12	Dissecção de palmeiras para busca de triatomíneos	57
Figura 13	Armadilha para captura de pequenos mamíferos	59
Figura 14	Teste DipStick. (A) Resultado negativo, a seta indica a linha controle do teste. (B) Resultado positivo, o triângulo marca a linha de teste positivo e a seta, a	63

	linha controle do teste (Rosypal <i>et al.</i> 2011)	
Figura 15	Xenodiagnóstico realizado em coelho capturado	64
Figura 16	Asa direita de <i>Panstrongylus megistus</i> . Os círculos numerados correspondem aos oito pontos de referência utilizados	66
Figura 17	Mapa da distribuição de Kernel para localidades infestadas por <i>P. megistus</i> em Jaboticatubas no período de 2007 a 2010. o= localidades não infestadas; ▲ = localidades infestadas	79
Figura 18	Localização de palmeira onde foi encontrada a colônia de <i>P. megistus</i> , na borda de mata da localidade Campo Grande II, Jaboticatubas, MG	85
Figura 19	Roedor encontrado na palmeira de macaúba infestada por <i>Panstrongylus megistus</i> na localidade Campo Grande, Jaboticatubas	85
Figura 20	Distribuição das localidades de origem de cães examinados quanto à infecção por <i>T. cruzi</i> em Jaboticatubas, MG, nos anos de 2009 e 2010	90
Figura 21	Tamanho centroide das asas de fêmeas (♀) e machos (♂) de <i>Panstrongylus megistus</i> do intradomicílio (Intra), peridomicílio (Peri) e ambiente silvestre dos municípios de Santana do Riacho (S. Riacho) e Jaboticatubas (Jabo), MG. As barras em azul representam os indivíduos e as caixas vermelhas os percentis 25% e 75%	91
Figura 22	Mapa fatorial da primeira (CV1) e segunda (CV2) variáveis canônicas da análise discriminante da variação total de conformação de <i>Panstrongylus megistus</i> procedentes do intradomicílio (Intra), peridomicílio (Peri) e ambiente silvestre dos municípios de Santana do Riacho (S. do Riacho) e Jaboticatubas (Jabo)	92
Figura 23	Árvore UPGMA das Distâncias de Mahalanobis de <i>Panstrongylus megistus</i> procedentes do intradomicílio (Intra) e peridomicílio (Peri) dos municípios de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (S. Riacho), e do ambiente silvestre de Jaboticatubas	93
Figura 24	Perfis de RAPD gerados pelo iniciador 3302 visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata. Canaletas <b>1, 15, 30, 44 e 45</b> : padrão de peso molecular (PM); canaleta 43: controle negativo	95
Figura 25	Fenograma construído a partir da matriz de presença e ausência de caracteres obtidos pela análise de RAPDs utilizando o coeficiente de associação de Dice e UPGMA. A linha vertical representa a linha de fenon; <b>PERI</b> = peridomicílio; <b>INTRA</b> = intradomicílio; seguidos dos nomes das localidades de origem: <b>SBen</b> = São Benedito, <b>BPapagai</b> = Barreiro do Papagaio, <b>CGr</b> e <b>CGrande</b> = Capão Grande, <b>SAntônio</b> = Santo Antônio, <b>VGrande</b> = Vargem Grande, <b>SJosé</b> = São José, <b>BJardim</b> = Bom Jardim, <b>TVermel</b> = Terra Vermelha, <b>SJSerra</b> = São José da Serra, <b>Derrubad</b> = Derrubada, <b>Guaraz</b> = Guarazinho, <b>SCipó</b> = Serra do Cipó, <b>BPaciênc</b> = Barreiro da Paciência, <b>Laranj</b> = Laranjeiras, <b>CAlto</b> = Capão Alto, <b>JDias</b> = José Dias, <b>CMoreir</b> = Capão Moreiras, <b>AGCorrei</b> = Alto Geraldo Corrêa	97
Figura 26	Mapa do município de Jaboticatubas com as localidades de origem dos <i>Panstrongylus megistus</i> utilizados na análise de RAPD	98

## Lista de tabelas

Tabela I	Índices de prevalência da doença de Chagas nos municípios da região da Serra do Cipó, MG, na década de 80	42
Tabela II	Pesquisas de campo e metodologias para busca de triatomíneos no ambiente silvestre dos municípios de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (SR)	54
Tabela III	Áreas investigadas quanto à presença de mamíferos silvestres nos municípios de Santana do Riacho (SR) e Jaboticatubas (Jabo), MG	58
Tabela IV	Número de cães amostrados por localidade no município de Jaboticatubas nos anos de 2009 e 2010	62
Tabela V	Número de <i>Panstrongylus megistus</i> utilizados na análise de morfometria geométrica por município, ecótopo e sexo	66
Tabela VI	Número e porcentagem de localidades e unidades domiciliares investigadas pelo PCDCH no município de Jaboticatubas, MG, Brasil, nos anos de 2007 a 2010	76
Tabela VII	Número (n) e porcentagem (%) de unidades domiciliares positivas e de triatomíneos capturados no município de Jaboticatubas no período de 2007 a 2010	77
Tabela VIII	Índices entomológicos por espécie e totais do PCDCH no município de Jaboticatubas, Minas Gerais, no período de 2007 a 2010	77
Tabela IX	Número (n) e porcentagem (%) de ninfas e adultos de <i>Panstrongylus megistus</i> capturados por ecótopo e colonização no município de Jaboticatubas no período de setembro de 2007 a setembro de 2010	78
Tabela X	Espécies e número de triatomíneos capturados no município de Santana do Riacho no período de setembro de 2007 a setembro de 2010	80
Tabela XI	Número (n) e porcentagem (%) de ninfas e adultos de <i>Panstrongylus megistus</i> capturados por ecótopo e colonização no município de Santana do Riacho no período de setembro de 2007 a setembro de 2010	81
Tabela XII	Número e porcentagem de armadilhas de Noireau e palmeiras infestadas e triatomíneos capturados em pesquisas no ambiente silvestre dos municípios de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (SR)	83
Tabela XIII	Infestação, densidade populacional e infecção de triatomíneos capturados pela dissecação de palmeiras nos municípios de Santana do Riacho e Jaboticatubas, MG	86

Tabela XIV	Mamíferos capturados em ambientes silvestres dos municípios de Santana do Riacho (SR) e Jaboticatubas (Jabo), MG	87
Tabela XV	Distâncias de Mahalanobis (acima) e suas significâncias (abaixo) entre os grupos de <i>Panstrongylus megistus</i> provenientes do intradomicílio (Intra) e peridomicílio (Peri) de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (SR), e do ambiente silvestre (Silv) de Jaboticatubas	92
Tabela XVI	Taxa de reclassificação de <i>Panstrongylus megistus</i> provenientes do peridomicílio e intradomicílio dos municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho	93
Tabela XVII	Descrição da origem dos <i>Trypanosoma cruzi</i> isolados em Jaboticatubas e Santana do Riacho e caracterizados molecularmente	99



## Lista de abreviaturas

μL	microlitro
DC	doença de Chagas
DNA	ácido desoxirribonucleico
ITS	Espaçador Transcrito Interno
mm	milímetros
mtDNA	DNA mitocondrial
ParnaCipó	Parque Nacional da Serra do Cipó
PCDCH	Programa de Controle da Doença de Chagas
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIT	Posto de Informação Triatomínica
RAPD	Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição
SIG	Sistema de Informação Geográfica
UD	unidade domiciliar

## Resumo

A doença de Chagas (DC) é uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja principal forma de transmissão é através das fezes de triatomíneos infectados. O *Panstrongylus megistus* atualmente é o principal vetor do Brasil, sendo responsável pela transmissão da DC na região da Serra do Cipó, MG, na década de 80. O *P. megistus* possui alta capacidade de reinfestação das casas, exigindo permanente vigilância contra a instalação de novos focos. O peridomicílio apresenta grande importância para a manutenção de triatomíneos e do *T. cruzi* circulando entre barbeiros e os animais que o frequentam. O objetivo do trabalho foi avaliar o cenário ecoepidemiológico da doença de Chagas no entorno do Parque Nacional da Serra do Cipó (ParnaCipó), visando subsidiar o programa de controle do *P. megistus*. O estudo se realizou nos municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho que, juntamente com Morro do Pilar e Itambé do Mato Dentro, integram o ParnaCipó. O perfil de infestação pelo *P. megistus* foi determinado através de captura de triatomíneos nas unidades domiciliares (setembro de 2007 a setembro de 2010) e capturas silvestres, que também incluíram avaliação da infecção em marsupiais e roedores. Cães levados à campanha de vacinação antirrábica de Jaboticatubas foram examinados a fim de determinar sua importância epidemiológica na região. Exemplares de *P. megistus* capturados foram utilizados para análise populacional pela morfometria geométrica. Os exemplares provenientes de Jaboticatubas foram ainda analisados por RAPD para estudo populacional. As cepas isoladas dos reservatórios e vetores foram caracterizadas como pertencentes ao grupo *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II utilizando-se DNA satélite como alvo. A maioria dos exemplares *P. megistus* foi capturada em galinheiros; no intradomicílio o ecótopo preferencial foi o quarto. Foram realizadas pesquisas em 15 áreas silvestres com a captura de 105 mamíferos, com taxa de infecção de 6,7%; todas as cepas foram caracterizadas como *T. cruzi* I. A prevalência em cães foi de 2,4%. Em palmeiras foram capturados *Rhodnius neglectus*, *P. megistus* e *Triatoma sordida*. Dentre as cepas isoladas de triatomíneos domiciliados e silvestres, apenas uma cepa proveniente do ambiente domiciliar foi caracterizada como *T. cruzi* II, as demais, *T. cruzi* I. A morfometria diferenciou a população silvestre das domiciliadas. A RAPD demonstrou grande variabilidade dos *P. megistus* de Jaboticatubas, entretanto, sem diferenciação populacional. Frente aos resultados, podemos concluir que a população rural dos dois municípios permanece sob o risco de infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que são encontrados vetores e reservatórios infectados no ambiente artificial e natural, e podem infestar as habitações a partir de diversos focos, domiciliados ou silvestres.

## Abstract

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, whose main mode of transmission is through the feces of infected bugs. *Panstrongylus megistus* is currently the main vector in Brazil, being responsible for the CD transmission in Serra do Cipo, MG, in the 80s. *P. megistus* has high capacity to reinfestate the houses, requiring constant vigilance against the installation of new focus. The peridomicile has great importance for the maintenance of triatomine bugs and the *T. cruzi* circulating among triatomines and the animals that occur in this environment. The objective of this study was to evaluate the ecoepidemiologic scenario of Chagas disease in the surrounding of the National Park of Serra do Cipo (ParnaCipó), aiming to support the control program of the *P. megistus*. The study was conducted in the municipalities of Jaboticatubas and Santana do Riacho, which together with Morro do Pilar and Itambé do Mato Dentro, integrate the ParnaCipó. *P. megistus* infestation profile was determined by capturing triatomines in the households (September 2007 to September 2010) and in wild captures, which were also performed to evaluate the rodents and marsupials infection. Dogs carried to the anti-rabies vaccination campaign of the Jaboticatubas were examined to determine their prevalence in the region. The *P. megistus* exemplaries captured were used to the geometric morphometry analysis. Specimens from Jaboticatubas were further analyzed by RAPD for population study. The strains isolated from reservoirs and vectors were characterized as *T. cruzi* I or *T. cruzi* II using satellite DNA as target. Most *P. megistus* was captured in chicken coops; inside the houses the preferred ecotope was the bedroom. Were investigated 15 wild areas with the capture of 105 mammals, with infection rates of 6.7%, all strains were characterized as *T. cruzi* I. The prevalence in dogs was 2.4%. In the palm trees examined were captured *Rhodnius neglectus*, *P. megistus* and *Triatoma sordida*. Among the strains isolated from the domiciled and wild triatomines, only one from the intradomicile was characterized as *T. cruzi* II, the others were *T. cruzi* I. The morphometric analysis differentiated the wild from the domestic populations. The RAPD showed great variability of *P. megistus* in Jaboticatubas, however, without population differentiation. Based on the results, we conclude that the rural population of both municipalities remains at risk of infection by *T. cruzi*, since the infected vectors in artificial and natural environment follow to be found, and can infest the dwellings from various domestic or wild focus.

## **1** *Introdução*

---



10 a 30 anos após o início da fase crônica, 30 a 40 % dos indivíduos infectados irão desenvolver uma das formas determinadas da fase crônica: cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Dias 1995). A DC representa a principal causa de lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente ativos nos países endêmicos (Moncayo & Silveira 2009).

A principal forma de transmissão da DC é através das fezes infectadas dos triatomíneos. A via vetorial é responsável por aproximadamente 80% dos casos de infecção humanos. Outros mecanismos de infecção são: transfusão sanguínea, transmissão oral, acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e de forma congênita (Dias 1987).

Considerando que não há imunização para a DC, que são muitos os reservatórios animais, e que as drogas existentes são eficazes somente em casos de infecção recente (estes muitas vezes clinicamente inaparentes), a única opção para o controle da transmissão natural é a diminuição do contato do homem com o vetor. Para tal, duas alternativas são sugeridas: impedir seu ingresso ou eliminar as populações de triatomíneos já instaladas no ambiente domiciliar (Silveira & Dias 2011).

## 1.2 O Controle Vetorial da Doença de Chagas no Brasil

As primeiras campanhas contra a DC no Brasil iniciaram-se em 1950 pelo Serviço Nacional de Malária, que realizaram a busca de triatomíneos em 125 municípios de estado de Minas Gerais. Deste período a 1968 foram realizados inquéritos entomológicos em 1.760 municípios brasileiros, sendo em 1.238 deles verificada a colonização domiciliar por triatomíneos (Silveira & Dias 2011).

O Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH) foi estruturado ao nível nacional em 1975 a partir das experiências bem sucedidas do Serviço Nacional de Malária. O objetivo era o de focalizar a infestação, independentemente das espécies vetoras. Foi estabelecido que as ações deveriam ser desenvolvidas em áreas contíguas e progressivamente crescentes, devido à grande extensão da área endêmica no Brasil (Silveira & Dias 2011). A metodologia do PCDCH compreendia três fases: preparatória, de ataque e de vigilância. A primeira consistia do reconhecimento geográfico, mapeamento de localidades e unidades domiciliares, e do levantamento triatomínico, através da busca ativa de vetores casa a casa. Na fase de ataque todas as unidades domiciliares de localidades infestadas por triatomíneos foram borrifadas com BHC a cada seis meses, devido à baixa residualidade e nenhuma ação ovicida do inseticida. A fase de vigilância é instalada quando 5% ou menos de localidades do município estejam infestadas. Quando atingido esse objetivo, a pesquisa entomológica passa a abranger as localidades infestadas no ciclo anterior, as limítrofes a essas e um percentual de localidades negativas eleitas de forma aleatória. A vigilância epidemiológica passa a ser complementada pelas notificações da população através dos Postos de informação para Triatomíneos (PITs), instalados em localidades com maior risco de reinfestação (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública / SUCAN 1980).

A instalação do PCDCH permitiu a sistematização da metodologia e o aumento da área investigada. Três anos após seu início, já havia sido alcançado 60% da área endêmica, abrangendo 1.113 municípios em 13 estados brasileiros, indicando infestação global de 4,1% das unidades domiciliares investigadas. A espécie de maior dispersão era então o *Panstrongylus megistus* (Burmeister 1835) seguido do *Triatoma infestans* (Klug 1834) (Marques 1979). A partir de 1983 inicia-se o plano de expansão do programa, passando a

cobrir toda a área com risco de transmissão vetorial e, assim, completando a fase preparatória do controle entomológico. Ainda neste ano, parte da área coberta desde 1975 (267 municípios em 11 estados) já se encontrava sob vigilância, com risco mínimo de transmissão vetorial. Em Minas Gerais, 9,2% dos municípios cobertos pelo PCDCH estavam na fase final do controle (Silveira & Dias 2011).

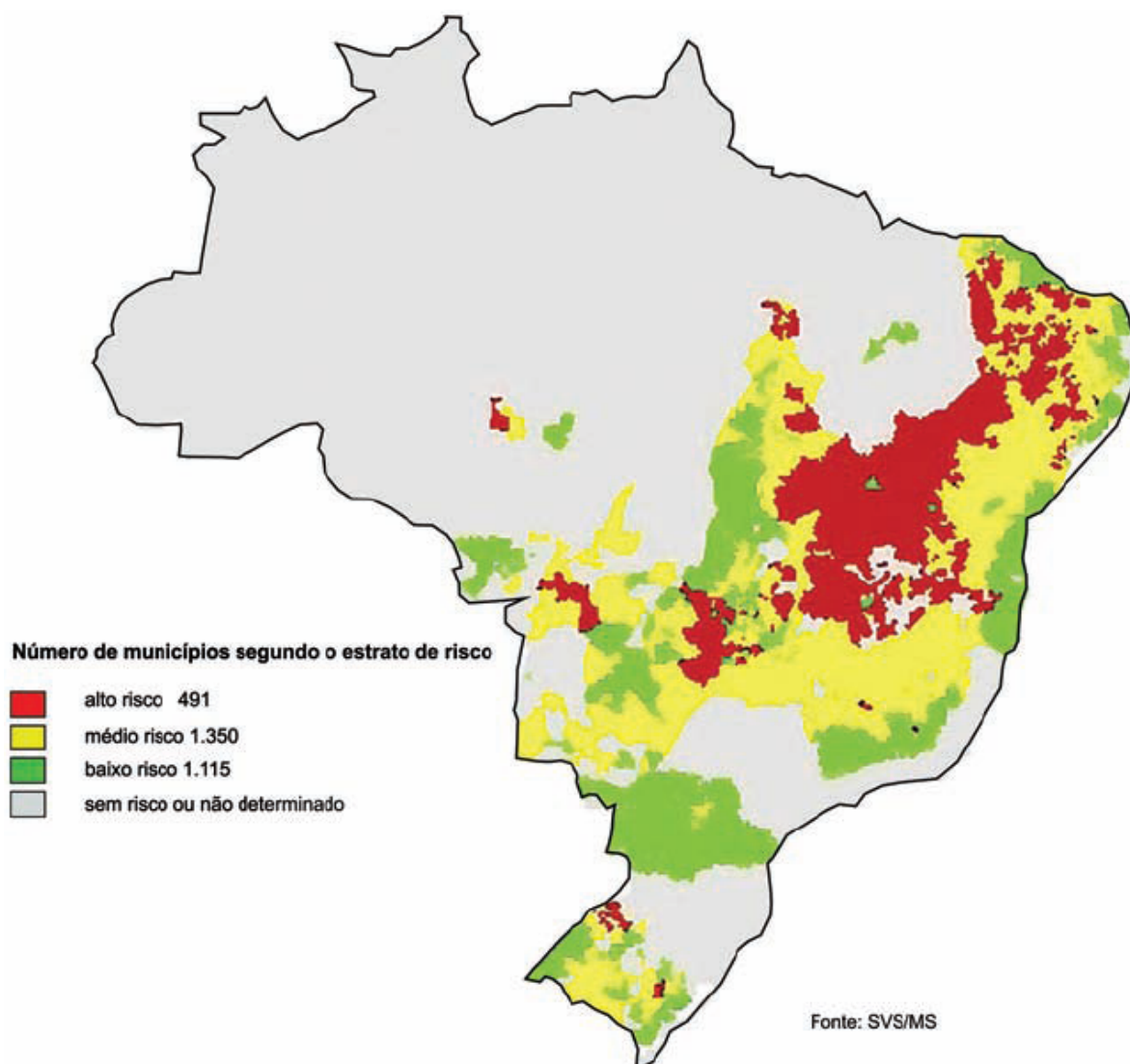
A partir de 1986, grande parte dos recursos destinados ao PCDCH foi transferida para o controle de repetidas epidemias de dengue, entretanto, não afetou de forma significativa o desempenho do programa (Vinhães & Dias 2000; Silveira & Dias 2011).

Em 1992, foi criada pelos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), por meio da organização Panamericana de Saúde, uma iniciativa (INCOSUL/Chagas) para a eliminação da domiciliação do *T. infestans* e interrupção da transmissão do *T. cruzi* por transfusão sanguínea (Oficina Sanitaria Panamericana 1992). Para o Brasil, o compromisso internacional garantia a manutenção das ações de controle frente à emergência de outras enfermidades e os já baixos níveis de transmissão da DC no país (Silveira & Dias 2011).

No ano de 1999 os programas de controle de endemias foram descentralizados, transferindo as responsabilidades para o estado e municípios (Portaria 1.399 do Ministério da Saúde, Diário Oficial da União de 16 de dezembro de 1999). Para tal foram criadas as Diretorias de Ações Descentralizadas de Saúde sediadas nos município de maior importância política e econômica, com as funções de capacitação dos agentes municipais e de supervisão e normatização dos programas (Villela *et al.* 2005).

Frente às diversas situações observadas atualmente no país e devido à descentralização do PCDCH, em 2006 propôs-se a estratificação de risco dos municípios baseada em variáveis influentes no processo de transmissão vetorial da DC. A estratificação agrupou 2.956 municípios em alto, médio e baixo risco (Figura 2).





**Figura 2** – Mapa de risco da transmissão vetorial domiciliar da doença de Chagas ou de seu restabelecimento nos municípios brasileiros. 2006. (Silveira & Dias 2011)

As ações de controle, mudanças ambientais, econômicas e sociais determinaram que o risco atual de transmissão vetorial da DC no Brasil está restrito a determinadas áreas, vetores e situações epidemiológicas peculiares (Silveira & Dias 2011). Do ponto de vista epidemiológico, Silveira & Dias (2011) descrevem o quadro atual do país nas seguintes situações: a) baixo risco do retorno da transmissão vetorial por espécie alóctone; b) risco de transmissão focalizada por espécies nativas, tais como, *P. megistus*, *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911, e menos provável por *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola 1964 e *Triatoma sordida* (Stål 1859); c) domiciliação de algumas espécies até então estritamente silvestres; possibilidade de ocorrência de transmissão extradomiciliar ou por invasão de triatomíneos às casas.

A prática do PCDCH mostrou que espécies de triatomíneos introduzidas são passíveis de eliminação e, conseqüentemente, interromper a transmissão vetorial em sua área de ocorrência, desde que não existam espécies autóctones. Estas são passíveis de controle quanto à colonização domiciliar por meio do uso de inseticidas e da vigilância epidemiológica constante (Silveira & Dias 2011).

As espécies de triatomíneos introduzidas no Brasil são o *T. infestans* e o *Triatoma rubrofasciata* (De Geer 1773), esta sem importância epidemiológica visto que quase sempre está associada a roedores domésticos. Ainda que remanescentes alguns focos de *T. infestans*, considerou-se a transmissão improvável pela baixíssima infestação e densidade das populações existentes (Silveira & Dias 2011). Por consequência, em 2006, o Brasil foi certificado pela interrupção da transmissão da DC por essa espécie (Ferreira & Silva 2006).

Atualmente, as espécies nativas se mantêm com ampla dispersão e populações domiciliadas, com grande redução da colonização domiciliar (Silveira *et al.* 2001). Algumas alterações no quadro eco-epidemiológico foram observadas, a espécie mais capturada pelo PCDCH no Brasil passou a ser o *T. sordida*, quase em sua totalidade colonizando o peridomicílio. Algumas espécies estritamente silvestres passaram a ser capturadas no ambiente artificial. Esse é o caso de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843), no estado do Rio Grande do Sul, e *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto 1923) no semiárido nordestino. Outras que eram raramente encontradas passaram a ser frequentemente capturadas no ambiente artificial, são elas: *Triatoma tibiamaculata* (Pinto 1926), *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto 1923, *Rhodnius pictipes* Stål 1872, *Rhodnius neglectus* Lent 1954, *Rhodnius nasutus* Stål 1859 e *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) (Silveira & Dias 2011).

Dentro do quadro atual descrito e com a negligência do PCDCH, devido aos baixos níveis de transmissão e por questões político-administrativas (Dias 2001), o maior desafio para o controle da transmissão vetorial é a continuidade da vigilância entomológica (Villela *et al.* 2005).

### 1.3 Os Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos hematófagos, da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, que constitui um grupo de 140 espécies dividido em cinco tribos: Rhodniini Pinto, 1926, Triatomini Jeannel, 1919, Cavernicolini Usinger, 1944, Bolboderini Usinger, 1944 e Alberproseniini Martinez & Carcavallo, 1997 (Schofield & Galvão 2009). Provavelmente derivaram de reduviídeos predadores, estes são amplamente distribuídos pelos continentes, mas a adaptação à hematofagia parece ter ocorrido somente nas Américas (Schofield 1988).

A tripanossomíase americana parece ter se iniciado devido às incursões das pessoas ao interior do continente. A instalação das casas neste ecossistema representou abrigo com ampla variedade de fontes alimentares para os triatomíneos, que colonizaram as habitações estabelecendo o ciclo doméstico da DC (Dias & Schofield 2009).

Atualmente, espécies de triatomíneos são encontradas na América em uma ampla variedade de ecótopos naturais associados a ninhos de pequenos vertebrados. Uma pequena minoria é capaz de ocupar nichos de animais peridomésticos e humanos, sendo estes os responsáveis pela transmissão do parasita ao homem (Lent & Wygodzinsky, 1979; Dias & Schofield 2009).

Desta forma, Dias & Diotaiuti (1998) conceituam espécies primárias ou secundárias de triatomíneos, sendo as primeiras àquelas especializadas em colonizar de maneira permanente as habitações humanas de uma determinada região, geralmente em altas densidades, com marcada antropofilia e que apresentam significativas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi*. São exemplos de espécies com importância epidemiológica primária: *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. infestans*. As espécies secundárias são geralmente autóctones da região, capazes de invadir e colonizar as casas em pequenas densidades. Na presença de uma espécie primária não são capazes de colonizar o intradomicílio. As espécies secundárias são autóctones e ubiquistas; em geral ocupam ecótopos naturais e artificiais próximos das casas, associados a reservatórios silvestres e peridomiciliares, apresentando diferentes graus de antropofilia, podendo, em algumas situações particulares, constituir grandes colônias. São

representantes desse grupo: *T. sordida*, *R. neglectus* e *Panstrongylus diasi* Pinto & Lent 1946.

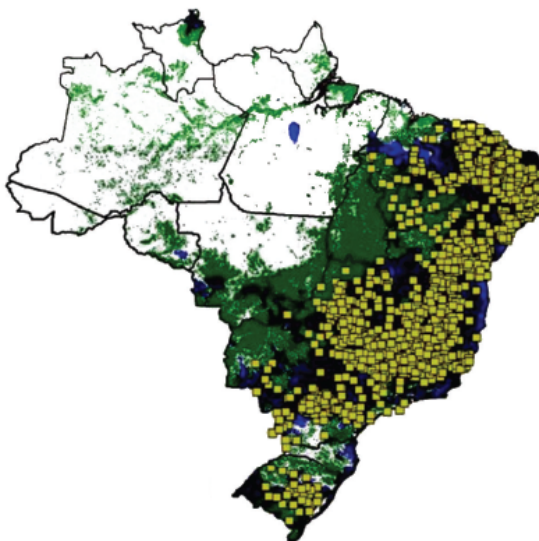
O *P. megistus* foi a primeira espécie de triatomíneo a ser incriminada como vetor da DC (Chagas 1909). É um triatomíneo de cor preta com manchas vermelhas (Figura 3), de tamanho grande, os machos medem aproximadamente 26 – 34 mm, e as fêmeas 29 – 38 mm de comprimento. É um vetor eficiente, frequentemente infectado pelo *T. cruzi*. Ocorre na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, e Uruguai (Lent & Wygodzinsky 1979). No Brasil apresenta ampla distribuição geográfica, do Maranhão ao Rio Grande do Sul (Figura 4) (Aragão 1961; Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012).



**Figura 3** – Vista dorsal do *Panstrongylus megistus*

No ambiente silvestre o *P. megistus* pode ser encontrado em diversos ecótopos, principalmente em anfractuosidades do tronco de árvores, espaços entre raízes, bromélias, cavidades no solo ou rochas, tufo densos de vegetação e copas de palmeiras. Nesses abrigos, a espécie tem como principais fontes de alimentação gambás, cuícas, morcegos, roedores e aves (Barretto 1979). Em contraste com a ampla variedade de habitats em que pode ser encontrada, a captura de *P. megistus* nos ecótopos silvestres exige muito esforço. No município de Bambuí, MG, onde foram desenvolvidos vários estudos acerca dessa espécie, em raras oportunidades foram capturados exemplares em palmeiras (Dias 1982), e, mais recentemente, foi encontrada uma colônia em uma cavidade de uma árvore (dos Santos

Júnior 2011). No sul do país, a espécie foi capturada em ninhos de marsupiais (dos Santos Júnior 2007). No estado do Rio de Janeiro também foi encontrada uma colônia em um ninho de marsupial em um oco de árvore, depois de investigados 16 ninhos de mamíferos (Miles *et al.* 1982).



**Figura 4** – Distribuição e projeção da ocorrência de *Panstrongylus megistus* no Brasil. Ocorrências conhecidas são representadas em quadrados amarelos e a predição consenso final em áreas pretas. Áreas identificadas como adequadas de acordo com condições climáticas são mostradas em azul, e áreas identificadas como adequadas baseada no índice de diferença de vegetação normalizada (NDVI) são demonstradas em verde (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012)

A valência ecológica (capacidade que a espécie tem de povoar diferentes ambientes caracterizados por grandes variações dos fatores biológicos) do *P. megistus* varia de acordo com a região em que ocorre. No sul do Brasil é predominantemente silvestre, raramente invade os domicílios e não são capazes de colonizar o ambiente artificial. Ao contrário, na região nordeste colonizam estes ambientes formando grandes colônias. Essa diferença comportamental pode estar relacionada à variação de umidade, dessa forma, a presença do *P. megistus* no ambiente natural estaria condicionada à umidade constante, e a colonização do domicílio, à sua diminuição em certas épocas do ano (Forattini *et al.* 1978).

O estado de São Paulo e o sudoeste de Minas Gerais representam a área de transição do comportamento dessa espécie, onde é considerado ubiquista (que se adapta a diferentes ambientes, inclusive ao intradomicílio, o que lhe confere maior importância epidemiológica) (Coura *et al.* 1966, Forattini *et al.* 1977b). Provavelmente esta espécie se originou nesta

região, que coincide com a transição climática entre as regiões centro-oeste e sul e de centros de dispersão de vertebrados. Este fato explica a associação do *P. megistus* com vertebrados silvestres, especialmente marsupiais, que também são representantes da fauna primitiva de mamíferos sul-americanos (Forattini *et al.* 1978).

A partir da sua área de comportamento ubiquista, representado pela Mata Atlântica, o *P. megistus* dispersou-se para todos os tipos de florestas extra-amazônicas com presença de coberturas vegetais fechadas e um teor mínimo de umidade (Aragão 1961; Forattini 1980). Barbosa *et al.* (2006) demonstram que a sua distribuição atual coincide com a ocorrência original da Mata Atlântica. Com a destruição da Floresta Atlântica, matas ou “manchas” residuais da vegetação original constituem focos de abrigo e manutenção de populações locais de *P. megistus*, podendo dispersar de forma ativa para ambientes artificiais (Forattini *et al.* 1977a, 1977b, 1978). Dessa forma, atualmente, o *P. megistus* ocorre nos quatro biomas principais observados no Brasil: Floresta Atlântica, áreas úmidas do Cerrado (representadas pelas matas de galeria), florestas remanescentes na Caatinga e nos Pampas (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012).

A destruição e modificação de seus ecótopos naturais associados às precárias condições habitacionais humanas e sua alta antropofilia, permitiram a entrada e instalação do *P. megistus* nos ambientes artificiais (Forattini 1980, Forattini *et al.* 1978, 1981). Além desses fatores, seu processo de domiciliação foi facilitado pela semelhança de condições encontradas àquelas dos seus ecótopos silvestres, como abrigo, umidade e alimentação farta, representada pelos moradores e animais domésticos (Aragão 1961, 1981).

Devido à sua ampla distribuição geográfica, sua capacidade de invadir e colonizar o domicílio e os altos níveis de infecção, atualmente o *P. megistus* é a espécie de maior importância epidemiológica no Brasil (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012). Sua importância no estado de Minas Gerais está muito bem definida, sendo responsável pela transmissão da DC em amplas áreas do Oeste de Minas (Dias, 1982). Com forte capacidade de recolonização das unidades domiciliares (UDs), exige permanente vigilância contra a instalação de focos domiciliares. Portanto, as comunidades rurais das áreas de ocorrência de *P. megistus* permanecem sob-risco de transmissão. Aparentemente, o principal problema no controle

destes triatomíneos é a reinfestação das casas tratadas, não existindo, até o momento, qualquer indicação de que esse processo seja devido aos insetos que sobrevivem à borrifação (focos residuais), ou a triatomíneos procedentes de focos silvestres.

O *T. sordida* é o triatomíneo mais capturado pelo PCDCH no Brasil (Forattini 1980; Diotaiuti *et al.* 1995; Silveira & Vinhões 1998). É uma espécie de porte mediano, com tamanho aproximado de 14-19 mm nos machos e 15-20 mm nas fêmeas (Figura 5). É considerada uma espécie de importância epidemiológica secundária, visto que coloniza preferencialmente o peridomicílio e apresenta marcada ornitofilia (Silveira *et al.* 1993). Entretanto, merece atenção da vigilância epidemiológica visto que é capaz de invadir e colonizar as habitações (Abad-Franch *et al.* 2009).



**Figura 5** - Vista dorsal do *Triatoma sordida*

Provavelmente essa espécie teve seu centro endêmico no Chaco Boliviano (Monteiro *et al.* 2009) e atualmente, apresenta ampla distribuição na Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (Carcavallo *et al.* 1999). No Brasil pode ser encontrada em Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Piauí, Distrito Federal, Goiás, Bahia e sul do Tocantins (Figura 6) (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012). No Brasil central é a espécie que representa maior risco para a transmissão natural da doença de Chagas (Silveira 2000).

No ambiente silvestre *T. sordida* é encontrado principalmente em ninhos de aves,

embaixo de cascas e dentro de ocos de árvores secas, típicas da região de cerrado (Forattini *et al.* 1971; Diotaiuti *et al.* 1993). Pode secundariamente ser encontrado na copa de palmeiras (Barretto *et al.* 1969).



**Figura 6** – Distribuição e projeção da ocorrência de *Triatoma sordida* no Brasil. Ocorrências conhecidas são representadas em quadrados amarelos e a previsão consenso final em áreas pretas. Áreas identificadas como adequadas de acordo com condições climáticas são mostradas em azul, e áreas identificadas como adequadas baseada no índice de diferença de vegetação normalizada (NDVI) são demonstradas em verde (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012)

*T. sordida* é encontrado em baixas densidades no meio silvestre e com menor frequência quando a cobertura florestal mostra-se mais ampla (Diotaiuti *et al.* 1993, Forattini *et al.* 1971). Quando o meio natural é degradado, estes apresentam a tendência de buscar ecótopos estáveis tais como o peridomicílio, que oferece abrigo, alimento e condições microclimáticas necessárias para o desenvolvimento de suas populações (Diotaiuti *et al.* 1993; Forattini *et al.* 1971; Schofield *et al.* 1999).

Sobre os padrões de dispersão da espécie, Forattini *et al.* (1971) formularam a hipótese que esta possa ocorrer através de dispersão passiva, em montes de lenha, de uma unidade domiciliar (UD) para outra. O encontro de ninfas desta espécie entremeadas a penas de pardais sugerem dispersão por aves. Forattini *et al.* (1975) afirmam que a mobilidade de *T. sordida* é considerável e condiz com sua grande valência ecológica; estabelecida por estudos os quais utilizavam-se de galinheiros experimentais, próximo a matas infestadas na região de Araraquara, SP.



Recentemente, no município de Macaúbas, Bahia, houve sete casos agudos de DC, dos quais dois pacientes evoluíram para óbito. A investigação entomológica incriminou *T. sordida* como potencial vetor responsável pela ocorrência dos casos. Foi encontrada uma população intradomiciliar na pia da cozinha. Nesse local eram armazenados os alimentos que, provavelmente foram contaminados e ingeridos pelos moradores da residência (Dias *et al.* 2008). No sul do estado do Tocantins também foi confirmado um caso de doença de Chagas aguda associado ao *T. sordida* (Diotaiuti *et al.* 2010).

Apesar do *T. sordida* ser uma espécie predominantemente peridomiciliar, com limitada capacidade de domiciliação, ressalta-se que o aumento da densidade populacional de triatomíneos no peridomicílio representa um grande risco para a população, pela manutenção do ciclo do *T. cruzi* em torno das casas, e uma vez que existe a possibilidade de invasão ou colonização do ambiente intradomiciliar (Diotaiuti *et al.* 1985, 1988).

Outra espécie de importância epidemiológica secundária é o *R. neglectus*. De coloração marrom clara, com manchas amarelas no corpo e marrom escuras na cabeça, as fêmeas medem 18.5 - 20.5 mm e os machos 17.5 - 19.0 mm (Figura 7) (Lent & Wygodzinsky 1979).



**Figura 7** – Vista dorsal de *Rhodnius neglectus*

*R. neglectus* possui ampla distribuição geográfica, no Brasil, ocorre na Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, São Paulo,

Distrito Federal, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Tocantins (Figura 8) (Galvão *et al.* 2003; Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012).



**Figura 8** – Distribuição e projeção da ocorrência de *Rhodnius neglectus* no Brasil. Ocorrências conhecidas são representadas em quadrados amarelos e a predição consenso final em áreas pretas. Áreas identificadas como adequadas de acordo com condições climáticas são mostradas em azul, e áreas identificadas como adequadas baseada no índice de diferença de vegetação normalizada (NDVI) são demonstradas em verde (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012)

Sua distribuição está associada ao cerrado brasileiro (Galvão *et al.* 2003), entretanto, tem sido encontrado em outros biomas como a Caatinga e Pantanal (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012). Uma das hipóteses é que *R. neglectus* seja disperso de forma passiva por aves, facilitada pelo fato dos ovos das espécies do gênero *Rhodnius* “grudarem” em suas penas, ou ainda pelo transporte de ninfas associadas aos ninhos de pássaros (Forattini *et al.* 1971).

Espécie predominantemente silvestre é extremamente associada às palmeiras, podendo ser encontrada em babaçus (*Attalea speciosa* Mart. ex. Spreng.), macaubeiras (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), buritis (*Mauritia flexuosa* L.f.) e ariruris (*Attalea butyracea* Mutis ex L.f.) (Diotaiuti & Dias 1984; Diotaiuti *et al.* dados não publicados). Às vezes estão associados a ninhos de aves (Barretto 1979).

Sua importância epidemiológica se deve ao fato de serem encontrados naturalmente infectados no ambiente silvestre, no peridomicílio e no intradomicílio (Lent & Wygodzinsky 1979; Barretto 1979; Diotaiuti & Dias 1984; Teixeira *et al.* 2001; Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004). *R. neglectus* invade frequentemente o intradomicílio (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2008) e

já foram relatados casos de colonização intradomiciliar em Minas Gerais, São Paulo e Goiás (Barretto *et al.* 1968, Silva *et al.* 1999).

Cabe neste contexto uma reflexão sobre o significado do peridomicílio para a manutenção de triatomíneos e do *T. cruzi* circulando entre barbeiros e os animais que frequentam o peridomicílio, e, eventualmente, o intradomicílio. Inquéritos realizados em Minas Gerais (Fernandes *et al.* 1994) e na Bahia (Pires *et al.* 1999), em áreas com predominância de *T. sordida* demonstram a presença nas UD's de muitos animais cuja importância epidemiológica está bem definida em outras regiões, como os cães (Gürtler *et al.* 2007), gatos (Fernandes *et al.* 1994), roedores e marsupiais (Gürtler *et al.* 1991). Alguns destes reservatórios têm sua importância exacerbada pela alta parasitemia que apresentam durante toda a infecção, não somente na fase aguda, o que os torna especialmente importantes como fonte de infecção convivendo com o homem. Este é o caso de cães, considerado por Gürtler *et al.* (1998) e Cohen & Gürtler (2001) como importante fator de risco para a transmissão do *T. cruzi* ao homem, baseado nas características de uma infecção permanente e prolongada e pela sua alta infectividade (Gürtler *et al.* 1996) para tripanosomas, quando comparado com crianças ou adultos. As altas parasitemias de marsupiais com determinadas cepas de *T. cruzi* também são bem descritas na literatura, sendo estes reservatórios considerados os de maior importância no ambiente silvestre, especialmente por serem sinantrópicos (Zeledón *et al.* 1970; Jansen *et al.* 1991).

#### 1.4 Estudos Biossistemáticos em Triatomíneos

Os estudos biossistemáticos estão contribuindo para compreender a estruturação espacial das populações de triatomíneos através da utilização de várias técnicas de caracterização de populações, como a morfometria geométrica (Matias *et al.* 2001; Jaramillo *et al.* 2002; Villegas *et al.* 2002; Gumiel *et al.* 2003; Schachter-Broide *et al.* 2004), a morfometria tradicional (Dujardin *et al.* 1997; Borges *et al.* 2000; Soares *et al.* 2001; Barbosa *et al.* 2003; Borges *et al.* 2005) e técnicas moleculares utilizando como marcadores regiões do DNA ribossomal (rDNA) (Marcilla *et al.* 2000, 2001, 2002; Pacheco *et al.* 2003), DNA mitocondrial (Monteiro *et al.* 1999, 2004; Dotson & Beard 2001; García *et al.* 2003; Abad-Franch *et al.* 2004), microssatélites (Harry *et al.* 1998; Anderson *et al.* 2002; García *et al.* 2004; Marcet *et al.* 2005, 2006; Richer *et al.* 2007; Dumonteil *et al.* 2007; Pérez de Rosas *et al.* 2007; Harry *et al.* 2008a, 2008b) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Borges *et al.* 2000, 2005; Pacheco *et al.* 2003; Barbosa *et al.* 2006) entre outras.

A morfometria, estudo da variação de forma e sua covariação com outras variáveis (Bookstein 1991), utiliza técnicas analíticas capazes de quantificar a variação morfométrica e separar os componentes genético e ambiental da característica analisada (Jaramillo & Dujardin 2006). A morfometria tradicional estima distâncias entre pontos anatômicos, ou seja, trabalha com medidas dos organismos; a morfometria geométrica utiliza as coordenadas destes pontos (Dujardin & Slice 2006). Dessa forma, esta última abordagem traz algumas vantagens: permite uma quantificação precisa das diferenças de conformação e a sua visualização em gráficos de deformação; através da obtenção de variáveis de conformação e de tamanho separadamente, é possível visualizar e testar a alometria (Bookstein 1991); é capaz de revelar todas as informações das relações espaciais entre esses pontos (Gumiel *et al.* 2003). As inferências acerca do tamanho dos grupos amostrais são realizadas com base no tamanho centroide, que representa o ponto central do polígono formado pelas coordenadas. Utilizando-se a distância de Mahalanobis calculada a partir dos fatores canônicos podem-se claramente inferir relações de proximidade entre os grupos estudados. Esta distância considera a variabilidade de cada unidade amostral, sendo recomendada para dados provenientes de delineamento experimentais, e, principalmente, quando as variáveis são correlacionadas (Cruz 1990).

A morfometria geométrica das asas tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais de triatomíneos. Jaramillo *et al.* (2002) observaram redução do tamanho de populações silvestres de *P. geniculatus* para seus descendentes obtidos em laboratório. Esses autores propõem um paralelo entre a população de criação em relação às naturalmente domiciliadas e sugerem que pelo menos cinco gerações são necessárias para a determinação de um marcador morfológico de colonização de habitações humanas. Um estudo de estruturação espacial de populações, utilizando morfometria geométrica, sugere que a recolonização de casas por *T. infestans* no norte da Argentina pode ser proveniente de uma fonte geográfica restrita, devido a forte estruturação populacional observada (Schachter-Broide 2004). Outro estudo de reinfestação comparou populações de *Rhodnius prolixus* Stål 1859, antes e após a borrifação com inseticida em vilas da Venezuela. Os dados morfométricos indicaram as populações silvestres, provenientes de palmeiras, como as principais responsáveis pela reinfestação dos ambientes domiciliares, entretanto, focos residuais também foram observados (Feliciangeli *et al.* 2007).

Estudos moleculares também têm sido amplamente utilizados em estudos biosistemáticos de triatomíneos. O rDNA de eucariotas consiste de inúmeras cópias de unidades codificadoras das duas subunidades ribossomais, separadas por dois espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) (Hillis & Dixon 1991). Estes espaçadores têm sido bastante utilizados em estudos taxonômicos porque evoluem com *taxa* distintas, e possuem sequências flanqueadoras altamente conservadas, favorecendo a construção de iniciadores universais (Kocher *et al.* 1989; Simon *et al.* 1990; Caldeira 1999). Estudos filogenéticos em variados níveis taxonômicos de triatomíneos têm sido realizados (Bargues *et al.* 2000, 2002, 2005; Marcila *et al.* 2000, 2001, 2002). Marcilla *et al.* (2000, 2001) demonstraram que o ITS-2 é um bom marcador para estudos populacionais de triatomíneos. Entretanto, em um estudo intra e interespecífico com espécies do gênero *Panstrongylus*, Marcilla *et al.* (2002) verificaram pouca divergência entre duas populações de *P. megistus* em relação a outras espécies.

O método de sequenciamento genético, produzido pela amplificação enzimática de fragmentos genômicos utilizando sequências arbitrárias de nucleotídeos sob-baixa stringência (RAPD), é considerado extremamente apropriado para a realização de mapas

genéticos, diferenciação específica animal e vegetal e impressões de DNA, com grande utilidade nos estudos de genética de populações (Williams et al. 1990). Esses fragmentos são amplificados a partir de iniciadores específicos, mas aleatoriamente distribuídos por todo o genoma, apresentando ainda a vantagem de automatização do mapeamento, o que aumenta o poder de análises genéticas de organismos que não apresentam amplo número de marcadores fenotípicos. Apesar dessas vantagens, a RAPD-PCR pode apresentar problemas na reprodutibilidade e interpretação das bandas (Adad-Franch & Monteiro 2005). Hadrys et al. (1992) estudaram as aplicações da RAPD na área da ecologia molecular e concluíram que ela pode ser utilizada na determinação de identidades taxonômicas, cálculos de graus de parentescos, análises de genomas bem como pode ser aplicada também na presença de pequenas quantidades de DNA.

Utilizando a técnica de RAPD no estudo de triatomíneos, Garcia *et al.* (1998) compararam diferentes gêneros, espécies e algumas populações deste grupo, conseguindo a diferenciação específica de tais insetos, inclusive de algumas consideradas morfologicamente similares (*Rhodnius ecuadoriensis* Lent & Leon 1958, *R. pictipes* e *R. nasutus*) e a confirmação da afinidade entre as mesmas. Dujardin *et al.* (1998), compararam populações de *R. prolixus* da Colômbia e Honduras, com dados de RAPD e morfométricos, e sugeriram que essa espécie foi introduzida no ambiente domiciliar da América Central recentemente, sem qualquer ligação com o ambiente silvestre. Populações de *T. brasiliensis* foram separadas segundo seu ecótopo, silvestre, peridomicílio ou domicílio, demonstrando, ainda, que o processo de domiciliação dessa espécie é decorrente de processos múltiplos de invasão das casas por exemplares silvestres (Borges *et al.* 2000, 2005). Barbosa *et al.* (2006), agruparam populações de *P. megistus* de diferentes áreas geográficas com suas respectivas origens biogeográficas.

A ecologia e a epidemiologia da paisagem representam um marco conceitual para o estudo dos sistemas em que interatuam múltiplas populações de vetores, hospedeiros e patógenos (Kitron 1998). Este enfoque foi aplicado com muito sucesso numa multiplicidade de doenças transmitidas por vetores (Kitron 1998; Kitron *et al.*, 1996, 1997; Rogers & Williams 1993), especialmente a partir da aparição de novas tecnologias, como os sistemas de informação geográfica (SIG) e de posicionamento global (GPS), das imagens satelitais e a

estatística espacial (Clarke *et al.* 1996). Estas ferramentas também contribuem para analisar e integrar o componente espacial nos programas de controle e vigilância, e para predizer potenciais riscos de transmissão de doenças (Kitron 1998).

O SIG tem sido cada vez mais utilizado no estudo de doenças transmitidas por vetores (Kitron 1998). Através do mapeamento dos habitats do parasito, vetor e hospedeiro é capaz de avaliar condições favoráveis para a dispersão, desenvolvimento, sucesso reprodutivo e sobrevivência dos mesmos (Goetz *et al.* 2000). Alguns estudos aplicaram essa metodologia para avaliação da distribuição de triatomíneos em relação à temperatura, umidade, vegetação e/ou altitude (Gorla *et al.* 1997, Cecere *et al.* 2004, 2006, Carbajal-de-la-Fuente *et al.* 2001, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2009, 2011).

## 1.5 O *Trypanosoma cruzi*

A família Trypanosomatidae parece ser monofilética (Stevens *et al.* 2001) e é representada por três principais clados: tripanosomatídeos aquáticos associados a peixes, anfíbios e répteis; tripanosomas africanos, associados a grandes herbívoros e transmitidos pela picada das moscas de cavalo e tsétsé; e tripanosomatídeos americanos, associados principalmente com marsupiais e outros mamíferos pequenos (Hoare 1973).

O *T. cruzi* provavelmente se originou a partir de formas ancestrais associadas a marsupiais (Stevens *et al.* 2001), e a sua transferência dos marsupiais a outros mamíferos provavelmente foi o principal fator de promoção das adaptações da sua forma original (*T. cruzi* I) para as várias formas atuais (*T. cruzi* II) (Brisse *et al.* 2003).

O *T. cruzi* apresenta grande diversidade intraespecífica que resulta em diferenças morfológicas das formas sanguíneas, virulência, patogenicidade, susceptibilidade a agentes quimioterápicos, propriedades imunológicas e infectividade das células hospedeiras (Murta & Romanha 1999). Em 1999 foi estabelecido um consenso para a padronização da nomenclatura atribuída ao parasita, assim, passam a serem reconhecidos dois principais grupos: *T. cruzi* I, associado com o ciclo silvestre da DC; e *T. cruzi* II, ao ciclo doméstico (Anonymous 1999). Entretanto, essa associação epidemiológica não é totalmente correta uma vez que ambos os grupos tem sido isolados tanto no ciclo doméstico quanto silvestre (Yeo *et al.* 2007).

Uma das metodologias utilizadas para classificar o parasito em *T. cruzi* I e *T. cruzi* II é a PCR *multiplex* da região de DNA satélite (Liarte *et al.* 2009). Este elemento possui 195 pb com 120.000 cópias por genoma (Gonzalez *et al.* 1984), por isto, pode ser detectada em quantidades mínimas de *T. cruzi* em uma diversidade de amostras, tais como, sangue infectado, biópsias de tecidos cardíacos e fezes de triatomíneos (Moser *et al.* 1989; Olivares-Villagómez *et al.* 1998; Machado *et al.* 2000; Virreira *et al.* 2003).

Atualmente, em estudos de epidemiologia molecular de *T. cruzi* tem sido utilizado o conceito de “discrete typing unit” (DTU), no qual as cepas são classificadas em DTU I a VI, onde DTU I corresponde a *T. cruzi* I e as demais, a subdivisões de *T. cruzi* II. Essa classificação é capaz de revelar aspectos epidemiológicos e evolutivos das diferentes cepas circulantes no



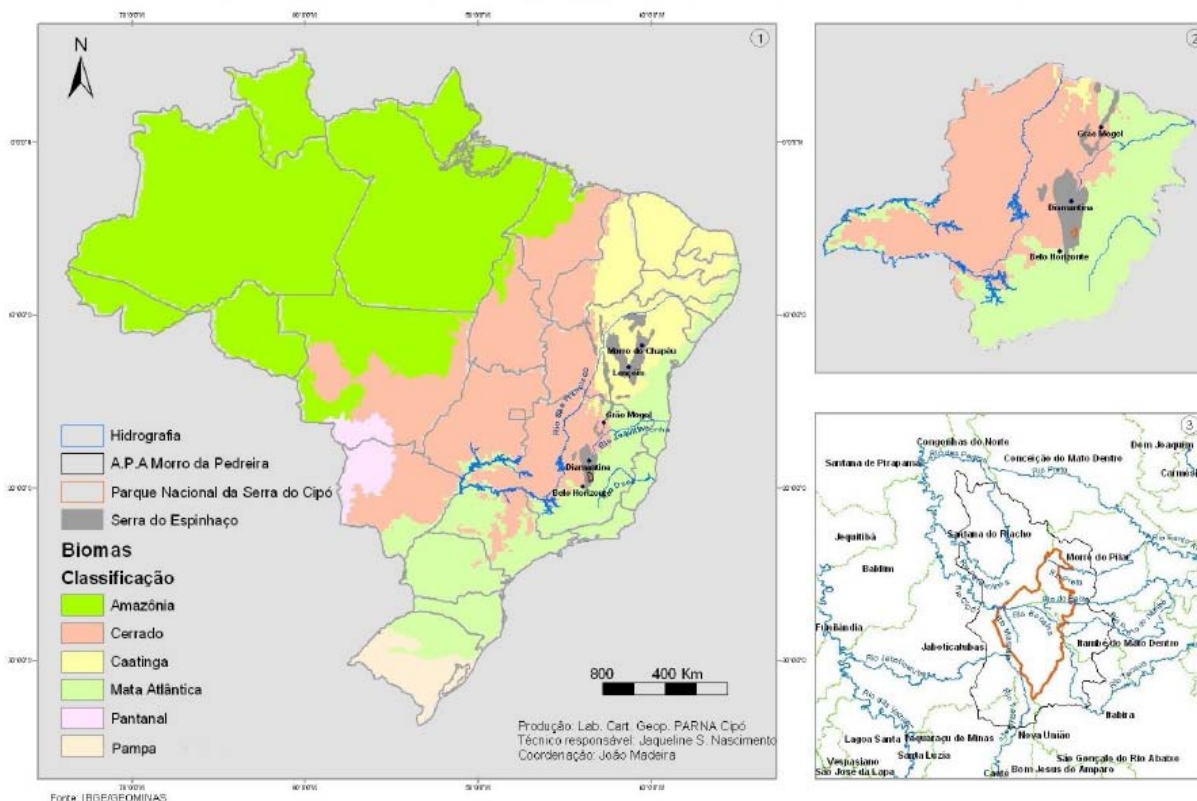
---

ambiente silvestre/doméstico (Lewis *et al.* 2009).

O intercâmbio entre o ciclo silvestre, peridoméstico e domiciliar do *T. cruzi* representa importante fonte de informação epidemiológica, o que pode ser analisado pelo perfil isoenzimático do parasita (Tibayrenc *et al.* 1984; Bogliolo *et al.* 1986; Sanchez *et al.* 1993; Jaramillo *et al.* 1999; Barnabé *et al.* 2000; Higo *et al.* 2000; Acosta *et al.* 2001), pela caracterização molecular das cepas de *T. cruzi* através do gen mini-exon (Souto *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 1998, 1999, 2001, Brisse *et al.* 2001; O'Connor *et al.* 2007), ou por polimorfismos de microssatélites, que têm se mostrado um excelente marcador para estudos filogenéticos de *T. cruzi* (Oliveira *et al.* 1998, 1999; Macedo *et al.* 2001), dentre outras técnicas genéticas.

## 1.6 A Serra do Cipó

A Serra do Cipó, localizada no estado de Minas Gerais, inclui os municípios de Jaboticatubas, Santana do Riacho, Morro do Pilar e Itambé do Mato Dentro. A região conta com duas unidades de preservação incluídas na Reserva da Biosfera da Serra do Espinhaço: o Parque Nacional da Serra do Cipó (ParnaCipó) e a Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira, que circunda o Parque a fim de minimizar o impacto sobre ele (Figura 9) (Madeira *et al.* 2008).



**Figura 9-** 1) Brasil, biomas, distribuição geográfica da Serra do Espinhaço e rios São Francisco, Doce e Jequitinhonha; 2) Os mesmos elementos em detalhe apresentando o Estado de Minas Gerais e localização do Parque Nacional da Serra do Cipó e Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira; 3) detalhe apresentando limites das duas unidades de conservação, limites dos municípios da região e seus principais rios (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / ICMBio 2009)

O ParnaCipó foi criado pelo Decreto Federal nº 90.223 em 1984 e tem área de 33.800 hectares e perímetro de 85 km. Local limítrofe entre os biomas da Mata Atlântica e do Cerrado, o parque está situado no limite sul da cadeia de Montanhas do Espinhaço, se configurando como o *divortium aquarum* das bacias dos Rios Doce e São Francisco. A região

inclui altitudes que variam de 800 a 1.670m. A vegetação é extremamente variada e diversa e o grau de endemismo é um dos maiores do mundo, e ainda abriga a mais extraordinária amostra de Campos Rupestres do Brasil. A unidade conta também com outras formações do tipo: Campos Cerrado, Campos Rupestres ou Campos de Altitude e Mata de Galeria (IBAMA 2007).

A fauna da região é muito vasta, porém pouco conhecida. Possui alto grau de endemismo, ressaltando-se os insetos e anfíbios. O Parque abriga ainda várias espécies ameaçadas de extinção, como o lobo-guará, cachorro-do-mato-vinagre, tamanduá-bandeira, veado-campeiro, onça-parda e gato-maracajá. Para a Botânica, a Serra do Cipó tem também valor inestimável, pela ocorrência de espécies restritas exclusivamente à sua área em todo o planeta, como a *Coccoloba cereifera* Schwacke, hoje ameaçada de extinção em decorrência das profundas alterações ambientais provocadas pelo asfaltamento da rodovia MG-10. Os valores culturais e históricos desta unidade residem nas pinturas rupestres, que indicam sinal de história do homem em eras passadas, sem contar os sítios arqueológicos de enorme valor histórico, que existem no seu entorno (IBAMA 2007).

Na região da Serra do Cipó - MG, o triatomíneo mais frequentemente encontrado nas casas desde a década de 80, é o *P. megistus*, responsável pelas consideráveis taxas de prevalência da DC nesta região (Tabela 1).

**Tabela I** - Índices de prevalência da doença de Chagas nos municípios da região da Serra do Cipó, MG, na década de 80.

<b>Município</b>	<b>Prevalência (%)</b>
Santana do Riacho	6,5
Jaboticatubas	13,9
Morro do Pilar	25,2
Itambé do Mato Dentro	7,5

Fonte: Ministério Saúde/SUCAM/DIDOCH, 1980

Atualmente, a Serra do Cipó tem sido alvo de grande expansão urbana, através da instalação de grandes condomínios e loteamentos, modificando a paisagem profundamente em algumas áreas onde, de acordo com os dados do PCDH de Jaboticatubas, o encontro de *P. megistus* é frequentemente notificado pelos moradores. Desta forma, a avaliação do

potencial genético e biológico do *P. megistus* poderá colaborar para o esclarecimento de aspectos relacionados ao processo de domiciliação do triatomíneo mais importante no Brasil, dentro de um contexto atual de urbanização e impacto ambiental, em especial para uma região de grande importância para a conservação do ambiente, como o é o ParnaCipó e seu entorno.

## **2** *Objetivos*

---

## 2.1 Objetivo geral

Descrever o cenário ecoepidemiológico da doença de Chagas no entorno do Parque Nacional da Serra do Cipó, visando subsidiar o programa de controle do *P. megistus*, principal espécie vetora na região.

## 2.2 Objetivos específicos

- Determinar os indicadores entomológicos do PCDCh no município de Jaboticatubas.
- Determinar as espécies de triatomíneos que invadem o ambiente domiciliar dos municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho.
- Determinar o perfil de infestação pelo *P. megistus* nos municípios de Jaboticatubas, e Santana do Riacho, no ambiente artificial e natural, a fim de avaliar seu potencial biológico.
- Determinar a infecção por *T. cruzi* em vetores e reservatórios da DC nos ambientes artificial e natural.
- Determinar a ocorrência de infecção em cães, marsupiais e roedores.
- Determinar a ocorrência de infestação das palmeiras de macaúbas por triatomíneos na região.
- Caracterizar a estrutura populacional dos *P. megistus* em Jaboticatubas e Santana do Riacho através de morfometria geométrica.
- Caracterizar a estrutura populacional de *P. megistus* provenientes de Jaboticatubas através da análise de ITS-2 e RAPDs.

- Através da caracterização populacional das amostras de *P. megistus*, avaliar seu potencial genético e possíveis origens de reinfestação.
- Caracterizar as cepas de *T. cruzi* circulantes nos municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho.





### **3.1 Caracterização da Área de Estudo**

O trabalho se realizou nos municípios de Santana do Riacho e Jaboticatubas localizados na região central do estado de Minas Gerais. São caracterizados como Área de Proteção Ambiental - APA, e historicamente apresentam domicílios infestados por triatomíneos (Tabela I). Ambos os municípios estão inseridos no bioma do cerrado, predominantemente, com áreas rupestres nos campos de altitude.

Jaboticatubas localiza-se a  $19^{\circ}30'50''S$  e  $43^{\circ}44'42''W$ , possui área de 1.114,155 Km<sup>2</sup>, 237 localidades, 10.554 domicílios, e uma população estimada de 17.134 habitantes, sendo que 6.394 estão vivendo em área rural (IBGE 2012).

Santana do Riacho localiza-se a uma latitude de  $19^{\circ}10'08''S$  e a uma longitude de  $43^{\circ}42'50''W$ , tendo uma área de 676.760 km<sup>2</sup>, 119 localidades e uma população de 4.023 habitantes em 2010, destes, 1.744 vivem em área rural (IBGE 2012).

### 3.2 Busca de Triatomíneos no Ambiente Artificial

A captura de triatomíneos no ambiente artificial contou com a colaboração dos programas municipais de controle, tendo sido disponibilizados pelas prefeituras agentes de saúde que realizaram todas as buscas nas UD's, sendo esta constituída pela casa e seus anexos (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública 1980).

A pesquisa de infestação das UD's foi realizada por busca ativa, de acordo com a metodologia do PCDCH (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública 1980). A busca foi realizada na casa, anexos e outros sítios da unidade domiciliar, como cercas, monte de lenha, tijolos, telhas, entre outros. Todas as superfícies internas e externas de paredes, móveis e objetos diversos foram investigadas. As UD's positivas foram borrifadas com inseticida piretróide.

O período analisado corresponde aos anos de 2007 a 2010, onde foram obtidas as seguintes informações:

- número de localidades investigadas,
- número de unidades domiciliares investigadas,
- número de unidades domiciliares infestadas,
- número e espécies de triatomíneos capturados,
- número de triatomíneos examinados e positivos quanto à presença de tripanosomatídeos.

Os triatomíneos capturados foram identificados segundo Lent & Wygodzinsky (1979). Para análise da colonização e detalhamento dos ecótopos utilizados foram ainda anotadas informações complementares no período de setembro de 2007 a setembro de 2010, quando os triatomíneos capturados foram encaminhados ao Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas, onde foram identificados e examinados quanto à infecção pelo *T. cruzi* (item 3.10).

O PCDCH de Jaboticatubas investiga, a cada ciclo anual, todas as unidades domiciliares de pelo menos 20% das localidades existentes no município. São selecionadas

aquelas positivas no último ciclo, as adjacentes a estas e as historicamente reconhecidas como infestadas por triatomíneos. Além da pesquisa ativa, são também atendidas as notificações de encontro de triatomíneos realizadas pelos moradores aos PITs. O município de Santana do Riacho somente realiza atendimento aos PITs, por este motivo, não foram calculados os índices entomológicos referentes ao PCDCH deste município.

A partir dos dados obtidos pelo PCDCH de Jaboticatubas, foram calculados os seguintes índices entomológicos:

- infestação:  $\text{n}^\circ$  de casas infestadas por triatomíneos /  $\text{n}^\circ$  de casas examinadas x 100;
- densidade:  $\text{n}^\circ$  de triatomíneos capturados /  $\text{n}^\circ$  de casas examinadas;
- dispersão:  $\text{n}^\circ$  de localidades infestadas com triatomíneos /  $\text{n}^\circ$  de localidades examinadas x 100;
- infecção natural:  $\text{n}^\circ$  de triatomíneo com *T. cruzi* / número de triatomíneos examinados x 100.

### 3.3 Análise Espacial

Todas as localidades visitadas pelo PCDCCH foram georreferenciadas para análise da distribuição de *P. megistus* capturados no ambiente domiciliar em Jaboticatubas. O georreferenciamento foi feito com base em banco de dados do Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), e as localidades não constantes nessa base de dados foram georreferenciadas *in loco* utilizando um aparelho GPS de navegação (Garmin™ GPSMap 76cx).

Considerando a importância epidemiológica do *P. megistus*, foi realizada a análise exploratória de localidades infestadas por esta espécie. O mapa de agrupamento foi obtido utilizando-se a função quártica do estimador de densidades de Kernel (Bailey 1995). Este consiste em uma técnica não paramétrica que promove a suavização estatística da densidade local do evento sobre a área estudada, obtendo-se uma superfície de “risco” para sua ocorrência, favorecendo a visualização do fenômeno de interesse (Santos *et al.* 2001). O cálculo para a intensidade do padrão de pontos na posição  $s$  é definido pela Eq. 1:

$$\hat{\lambda}_{\tau}(s) = \sum_{i=1}^n \frac{3}{\pi\tau^2} \left(1 - \frac{h_i^2}{\tau^2}\right)^2 \quad \text{Eq.1}$$

Onde:

$\hat{\lambda}_{\tau}(s)$  – é o valor estimado em um ponto  $s$ ;

$s$  – centro da unidade de área a ser estimada;

$\tau$  – é a largura da banda que define o grau de alisamento;

$h_i$  – distância entre o ponto  $s$  a ser estimado e o evento pontual  $s_i$ ;

$n$  – número total de pontos (eventos).

A largura de banda utilizada foi de 2.500 metros, definida com base no cálculo da função L com simulações (Eq. 2), a qual permite a visualização gráfica de intervalos em que existam padrões de agregação ou regularidade estatisticamente significativos para a ocorrência de fenômenos, baseada na hipótese da Aleatoriedade Espacial Completa

(Complete Spatial Randomness).

$$\hat{L}(h) = \sqrt{\frac{\hat{K}h}{\pi}} - h \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

$\hat{L}(h)$  – é o estimador da função  $L$ ;

$\hat{K}(h)$  – estimador da função  $K$ ;

$h$  – intervalos de distâncias de análise.

As análises espaciais foram realizadas com o programa SPRING 5.2 (Camara et al, 1996).

### 3.4 Busca de Triatomíneos no Ambiente Natural

No estudo silvestre foram incluídas capturas dentro do ParnaCipó, como área de referência com alteração antrópica interrompida há mais de 20 anos, e em áreas fora do Parque, também consideradas silvestres. Foram utilizadas armadilhas de Noireau (Noireau *et al.* 2002), armadilha luminosa e dissecação de palmeiras. Todos os locais trabalhados foram georreferenciados.

Foram investigadas quanto à presença de triatomíneos quatro áreas do município de Santana do Riacho, que pudessem representar diferentes contextos observados na região, e 11 em Jaboticatubas, no entorno de UDs infestadas e distribuídas de forma a abranger a maior cobertura do município. No interior do ParnaCipó foram investigadas uma de mata de galeria próxima à sede do Parque (Jaboticatubas) e outra fora do Parque, Engenho (Santana do Riacho). Nesta última, o trabalho realizou-se em duas ocasiões, uma em área aberta e outra em mata de galeria. Na Tabela II estão descritas as metodologias utilizadas por localidade para cada trabalho de campo.

As armadilhas de Noireau consistem em um frasco plástico de 10cm de altura e cinco de diâmetro, fechado com tela de arame parcialmente coberta com uma fita adesiva dupla face. No interior do recipiente é colocado um camundongo para a atração de triatomíneos (Figura 10). Foram utilizadas no mínimo 12 e no máximo 40 armadilhas de Noireau por noite em ocos de árvores, em possíveis tocas de animais e copas de palmeiras nos locais onde foram realizados trabalhos de campo no ambiente silvestre, exceto para as incursões exclusivas para derrubada de palmeiras.

**Tabela II** – Pesquisas de campo e metodologias para busca de triatomíneos no ambiente silvestre dos municípios de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (SR)

período	município	localidade/ coordenadas	armadilhas Noireau/ noite	noites com armadilha luminosa	palmeiras dissecadas
02 a 06/02/2009	Jabo	Sede do ParnaCipó 0645052 /7859944	30	X	X
01 a 04/06/2009	SR	Engenho (Lapa) S 19°34'31.7" W 43°60'26.6"	40	4	4
21 a 25/09/2009	SR	Serra Morena S 19°15'42.7" W 43°35'10.7"	50	4	X
19 a 23/02/2010	SR	Jerônimo S 10°32'64.9" W 43°62'87.4"	50	1	2
23 a 26/02/2010	SR	Engenho (mata) S 19°34'31.7" W 43°60'26.6"	50	2	4
09 a 13/04/2010	Jabo	Espada -19296770-43704228	24	X	X
10 a 13/04/2010	Jabo	Capão dos Moreiras -19449130 /-43738606	25	X	X
03 a 07/05/2010	Jabo	São José da Serra -19296595 /-43704558	21	X	X
03 a 07/05/2010	Jabo	Lapinha -19402422 /-43638230	24	X	X
17 a 21/05/2010	Jabo	Felipe -19506713 /-43661597	24	X	X
17 a 21/05/2010	Jabo	Bom Jardim – faz. -19.487.322 /-43.660.552	24	X	X
31/05 a 04/06/2010	Jabo	Guarazinho -19.319.632 /-43.775.585	24	X	X
31/05 a 04/06/2010	Jabo	Terra Vermelha -19.308.197 /-43.763.783	24	X	X
29/05 a 02/06/2010	Jabo	Juá II -19.477.300 /-43.847.582	15	X	X
29/05 a 02/06/2010	Jabo	Campo Grande II -19.491.002 /-43.849.283	31	X	X
11/04/2011	Jabo	Lapinha -19402422 /-43638230	X	X	3
12/04/2011	Jabo	Vargem Grande 318	X	X	3
13/04/2011	Jabo	São José da Serra -19296595 /-43704558	X	X	2
14/04/2011	Jabo	Campo Grande II -19.491.002 /-43.849.283	X	X	2
15/04/2011	Jabo	Bom Jardim – faz. -19.487.322 /-43.660.552	X	X	3



**Figura 10** - Armadilha de Noireau (Noireau *et al.* 2002)

As armadilhas luminosas foram montadas com dois lençóis brancos de aproximadamente 2x1,5m. Um dos lençóis foi esticado em uma armação de bambu e instalada uma lâmpada de 59W na sua parte superior. O outro foi esticado no chão para a visualização de possíveis insetos que caiam (Figura 11). As armadilhas eram montadas antes do alvorecer e observadas até às 21:00. Estas armadilhas só foram utilizadas em Santana do Riacho, pois em Jaboticatubas as pesquisas no ambiente silvestre foram realizadas simultaneamente em duas localidades, impossibilitando o seu acompanhamento pela equipe de campo reduzida.





**Figura 11** – Armadilha luminosa para atração de triatomíneos

A dissecação de palmeiras seguiu metodologia de Diotaiuti & Dias (1984). Depois de derrubadas, as folhas das palmeiras eram retiradas uma a uma e minuciosamente vistoriadas quanto à presença de barbeiros. Eram realizadas também buscas nas brácteas, cachos de cocos e caule (Figura 12). Em Santana do Riacho as capturas foram realizadas em duas localidades, Engenho, dentro do ParnaCipó, compreendida entre o rio Cipó e um lageado, ricamente povoado por palmeiras de macaúba. A outra localidade, Jerônimo, localiza-se em área mesclada por pastagens e capoeiras, também com muitas macaubeiras.



**Figura 12** – Dissecção de palmeiras para busca de triatomíneos

Em Jaboticatubas, onde se dispunha de mais informações sobre a infestação das casas, a área para a pesquisa nas palmeiras foi definida no entorno de cinco UD's onde se havia capturado anteriormente *P. megistus*.

### 3.5 Captura de Reservatórios Silvestres

Foram pesquisados ambientes silvestres próximos a algumas UD's que apresentaram infestação por triatomíneos, e locais selecionados no interior e entorno do ParnaCipó. Em Santana do Riacho, as áreas selecionadas foram as mesmas onde ocorreram a dissecação de palmeiras, Engenho e Jerônimo, e também uma mata de galeria próxima à entrada do ParnaCipó. No município de Jaboticatubas, a captura de reservatórios ocorreu ao redor (peridomicílio e ambiente silvestre) de casas onde foram capturado *P. megistus* anteriormente. Dentre estas, estão os locais onde também foi realizada a dissecação de macaubeiras. No total foram investigadas 14 áreas quanto à presença de pequenos mamíferos e utilizadas 456 armadilhas (Tabela III).

**Tabela III** – Áreas investigadas quanto à presença de mamíferos silvestres nos municípios de Santana do Riacho (SR) e Jaboticatubas (Jabo), MG

período	município	localidade	armadilhas / noite
02 a 06/02/2009	Jabo	Sede do ParnaCipó	30
01 a 04/06/2009	SR	Engenho (Lapa)	40
21 a 25/09/2009	SR	Serra Morena	50
19 a 23/02/2010	SR	Jerônimo	50
23 a 26/02/2010	SR	Engenho (mata)	50
09 a 13/04/2010	Jabo	Espada	24
10 a 13/04/2010	Jabo	Capão dos Moreiras	25
03 a 07/05/2010	Jabo	São José da Serra	21
03 a 07/05/2010	Jabo	Lapinha	24
17 a 21/05/2010	Jabo	Felipe	24
17 a 21/05/2010	Jabo	Bom Jardim – faz.	24
31/05 a 04/06/2010	Jabo	Guarazinho	24
31/05 a 04/06/2010	Jabo	Terra Vermelha	24
29/05 a 02/06/2010	Jabo	Juá II	15
29/05 a 02/06/2010	Jabo	Campo Grande II	31
<b>total</b>			<b>456</b>

Os marsupiais e roedores foram capturados em armadilhas tradicionais modelo Tomahawk (25 x 25 x 60 cm) armadas ao final do dia e verificadas no início da manhã (Figura 13). Como isca foi utilizada uma mistura de paçoca de amendoim, banana, emulsão Scott, baunilha e ração. A cada noite foram montadas 25 armadilhas, os locais selecionados foram georreferenciados.



**Figura 13** – Armadilha para captura de pequenos mamíferos

Os mamíferos capturados foram levados a um local apropriado para a realização dos procedimentos. Inicialmente os animais eram contidos em sacos de panos e imobilizados para serem anestesiados. Os fármacos utilizados foram Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina nas seguintes proporções e condições:

- marsupiais: Cloridrato de Ketamina (10 mg.kg<sup>-1</sup>) e Cloridrato de Xilazina (1 mg.kg<sup>-1</sup>), intramuscular, agulha 25x0,5mm;
- roedores: Cloridrato de Ketamina (40 mg.kg<sup>-1</sup>) e Cloridrato de Xilazina (5 mg.kg<sup>-1</sup>), intraperitoneal, agulha 25x0,5mm.

Os animais anestesiados foram submetidos ao xenodiagnóstico (item 3.7) e também obtida uma gota de sangue em papel filtro através da perfuração da artéria caudal para exame molecular de infecção por *T. cruzi* (item 3.10). Ao final dos procedimentos, os animais eram marcados pela raspagem de pelos da orelha. Já recuperados do efeito anestésico, os mamíferos foram soltos no mesmo ponto de captura ao final do dia.

As capturas foram realizadas de acordo com as leis brasileiras de proteção dos animais (licença IBAMA 14903-1, licença CEUA-FIOCRUZ L-032/09; Anexo 1).

### 3.6 Exames em Cães Domésticos

Como representantes de reservatórios domésticos, foi determinada a infecção de cães domésticos. Foram examinados cães levados pelo proprietário às campanhas de vacinação antirrábica do município de Jaboticatubas dos anos de 2009 e 2010. A coleta de sangue ocorreu em dois períodos pelo fato da campanha de vacinação ser realizada por duas equipes, onde uma cobre parte do município e a segunda as outras localidades. Dessa forma, a cada ano acompanhamos uma das equipes a fim de cobrir toda a extensão do município.

Os cães foram selecionados aleatoriamente, com o consentimento do proprietário, evitando-se os cães menores de 1 ano e com menos de 10 quilos. Foram obtidas amostras de sangue de 206 cães levados a 51 pontos de vacinação, em 43 localidades rurais e cinco bairros do município de Jaboticatubas (Tabela IV).

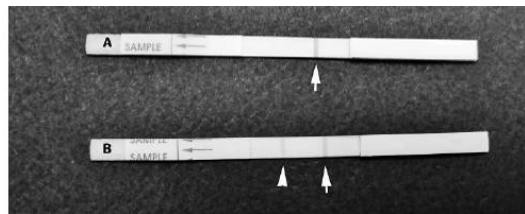
Uma amostra de aproximadamente 5 mL de sangue foi coletada da veia femural do animal e centrifugada a 300g por 10 minutos. O soro foi retirado e mantido a -20°C para posterior realização do teste rápido de detecção de tripanosomas em cães. Ao restante do sangue foi adicionado igual volume de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M pH 8,00 (Ávila *et al.* 1991), mantido a temperatura ambiente e após 15 dias foi fervida em banho-maria a 100°C por 15 minutos (Britto *et al.* 1993). O lisado foi estocado em temperatura ambiente. As amostras de sangue relativas aos soros reagentes no teste rápido de detecção de tripanosomas em cães, tiveram o DNA extraído utilizando-se o kit de Extração de DNA Genômico Wizard (Promega) segundo Ávila *et al.* (1991) (Anexo 2) e testado molecularmente (item 3.10).

O teste rápido de detecção de tripanosomas em cães (DipStick, Inbios) é um ensaio imunocromatográfico para a detecção de anticorpos caninos ao *T. cruzi*. A metodologia consiste na aplicação de 10ul de soro no local de amostra da fita, seguido da adição de três gotas de tampão, após 10 minutos a leitura foi realizada de acordo com a Figura 14 (Rosypal *et al.* 2011).

**Tabela IV** – Número de cães amostrados por localidade no município de Jaboticatubas nos anos de 2009 e 2010

ano	Localidade	Coordenada	número
2009	Bairro Bom Jardim*	sem identificação	6
	Bairro Pito Aceso*	S 19°30'44,8" W 043°45'20,3"	8
	Bairro São Sebastião*	S 19°31'38,7" W 043°44'26,8"	1
	Bairro União da Serra*	S 19°22'39,3" W 043°43'52,6"	3
	Bamburrall	S 19°34'21,5" W 043°46'56,4"	5
	Bebedouro	S 19°33'01,3" W 043°43'56,2"	2
	Bebedouro	S 19°32'58,2" W 043°43'45,9"	1
	Boa Vista	S 19°32'36,4" W 043°49'24,7"	1
	Boa Vista	S 19°34'01,2" W 043°48'38,6"	5
	Boiça	S 10°31'29,0" W 043°40'32,7"	9
	Bom Jardim	S 19°29'06,6" W 043°39'31,4"	7
	Bom Jardim	S 19°28'50,9" W 043°40'12,7"	4
	Cachoeira dos Palmares	S 19°36'12,0" W 043°48'09,6"	2
	Capão Clemente	S 19°28'50,4" W 043°46'37,7"	12
	Capão das Lages	S 19°30'30,9" W 043°44'07,2"	2
	Capão do Berto	S 19°17'23,8" W 043°41'07,8"	5
	Capão do Paulinho	S 19°21'03,5" W 043°41'01,9"	5
	Capão do Pio	S 19°25'20,4" W 043°42'3,0"	4
	Capão Grande	-19.491.002 /-43.849.283	7
	Capãozinho	S 19°24'24,0" W 043°44'13,8"	1
	Cardoso	S 19°21'10,1" W 043°40'34,7"	6
	Espada	S 19°18'01,6" W 043°42'13,1"	6
	Fazenda Santo Antônio	S 19°24'49,9" W 043°43'41,8"	1
	Felipe	S 19°30'11,4" W 043°39'55,3"	6
	João Congo	S 19°23'08,7" W 043°39'33,2"	3
	Paciência	S 19°32'25,5" W 043°44'23,8"	3
	Pedra Branca	S 19°31'29,3" W 043°49'18,1"	1
	Recanto do Sabiá	S 19°32'57,8" W 043°47'18,1"	1
Santana	S 19°31'52,7" W 043°41'47,1"	9	
São Sebastião do Campinho	S 19°29'36,5" W 043°48'55,5"	9	
Vargem Grande	S 19°21'47,6" W 043°43'43,3"	3	
2010	Alto João da Costa	-19,296,673 /-43,704,520	2
	Bairro JK*	sem identificação	3
	Barreiro	sem identificação	2
	Capão Grosso	-19,297,327 /-43,704,223	5
	Casas de Telha	-19,296,806 /-43,704,403	5
	Cruz de Minas	-19,296,745 /-43,704,286	4
	Currallinho	-19,296,796 /-43,704,328	8
	Fazenda Santo Antônio	-19,296,659 /-43,704,433	4
	Jacinto	sem identificação	2
	Joana	-19,296,807 /-43,704,197	4
	Matição	-19,297,110 /-43,703,990	8
	Mato Barreiro	-19,297,131 /-43,704,190	2
	Palhada Velha	-19,297,441 /-43,704,026	2
	Palma	-19,449,130 /-43,738,606	1
	Santo Amaro	-19,297,071 /-43,704,022	1
	São José da Serra	-19,297,333 /-43,703,974	7
	São José de Almeida	sem identificação	4
	Sapé	sem identificação	2
	Serra do Cipó	-19,297,002 /-43,704,105	1
	Terra Vermelha	-19,296,770 /-43,704,228	1
<b>Total</b>			<b>206</b>

\*Bairros na área urbana de Jaboticatubas, as demais localidades representam zonas rurais



**Figura 14** – Teste DipStick. (A) Resultado negativo, a seta indica a linha controle do teste. (B) Resultado positivo, o triângulo marca a linha de teste positivo e a seta, a linha controle do teste (Rosypal *et al.* 2011)



### 3.7 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico dos animais silvestres foi realizado com sete ninfas de 3º a 4º estágio de *R. neglectus* obtidas em criação de laboratório. Esta espécie foi escolhida por ser autóctone da região do ParnaCipó, pela facilidade de criação em insetário e pela rapidez com que se alimenta. Por essas razões, é considerado o triatomíneo padrão para a realização de xenodiagnóstico em animais silvestres pelo Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas.

Os triatomíneos são acondicionados em potes plásticos com 5 cm de altura e 4 cm de diâmetro, fechados com pano de algodão. Os recipientes foram fixados com a tampa de pano em contato com a pele do animal anestesiado utilizando-se fita crepe e/ou gaze (Figura 15). Os barbeiros usados no xenodiagnóstico foram analisados (item 3.7) 30 dias após a exposição em campo. Os reservatórios foram considerados positivos para o protozoário quando pelo menos uma ninfa utilizada no teste apresentou formas flageladas.



Figura 15 – Xenodiagnóstico realizado em coelho capturado

### 3.8 Exame Parasitológico de triatomíneos

Todos os triatomíneos utilizados no xenodiagnóstico e os capturados que chegaram vivos ao laboratório foram verificados quanto à infecção por *T. cruzi*. O exame parasitológico foi realizado nas fezes a fresco obtidas pela compressão abdominal dos insetos. As fezes foram diluídas em uma gota de solução salina 0,15M e observadas em microscópio óptico.

Os tripanossomatídeos observados foram isolados a partir do tubo digestivo dos triatomíneos e cultivados. A superfície externa do inseto foi desinfetada com álcool 70% e em seguida o triatomíneo foi dissecado em capela de fluxo laminar. O material obtido foi adicionado a 1 mL de meio de cultura LIT (Camargo 1964) e mantido em B.O.D. a 27°C para a multiplicação dos parasitos. As culturas foram observadas semanalmente em microscópio óptico e repicadas quando necessário. As amostras, quando livres de bactérias, foram criopreservadas a -70°C até a sua utilização para extração do DNA e caracterização molecular (item 3.10).

### 3.9 Caracterização dos triatomíneos capturados

#### 3.9.1 Morfometria Geométrica

Para a determinação da dinâmica do *P. megistus* entre os ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e silvestre, foi realizada a morfometria geométrica das asas. Para este estudo foram constituídas coleções de asas procedentes de capturas no intradomicílio e peridomicílio de 35 UDs e de uma captura no ambiente silvestre de Jaboticatubas, e de 16 UDs de Santana do Riacho (Tabela V).

**Tabela V** – Número de *Panstrongylus megistus* utilizados na análise de morfometria geométrica por município, ecótopo e sexo

Município	Ecótopo	Fêmeas	Machos	Total
Jaboticatubas	Intradomicílio	6	6	12
	Peridomicílio	45	46	91
	Silvestre	4	5	9
Santana do Riacho	Intradomicílio	4	5	9
	Peridomicílio	15	15	30
<b>Total</b>				<b>151</b>

As asas foram visualizadas em lupa com aumento de 80x e as imagens digitalizadas com máquina fotográfica digital. Foram utilizados oito pontos de referência na parte membranosa do hemiélitro (Figura 16), estes representavam interseções de nervuras bem definidas. As coordenadas dos pontos de referência foram obtidas utilizando-se o programa COO, versão 36.



**Figura 16** - Asa direita de *Panstrongylus megistus*. Os círculos numerados correspondem aos oito pontos de referência utilizados

Para a comparação dos tamanhos das asas entre os grupos, foi utilizado o tamanho centróide derivado das coordenadas (programa MOG, versão 75). O tamanho centróide é um estimador isométrico que representa o ponto central do polígono formado pelas coordenadas de cada indivíduo. Análises estatísticas foram realizadas para verificar diferenças significativas entre o tamanho centróide dos grupos e dimorfismo sexual (programa STATISTICA).

A Análise Generalizada de Procrustes, responsável pelo reposicionamento, reescala e reorientação dos pontos de referência também foi realizada com o programa MOG, versão 75 (Dujardin 2006). A Análise dos Componentes Principais para a remoção da alometria comum aos grupos foi realizada no programa COV, versão 35.

Devido ao baixo número amostral dos grupos ( $n < 2 \times$  o número de variáveis) do intradomicílio e silvestre de Jaboticatubas, e do intradomicílio de Santana do Riacho, a análise discriminante foi parcial e realizada com os oito primeiros fatores canônicos (programa PAD, versão 82). A partir das variáveis canônicas foram obtidas as distâncias de Mahalanobis, a significância entre estas distâncias (permutação) e construída uma árvore com UPGMA. Com as variáveis de conformação ainda foi realizado o teste de reclassificação dos indivíduos, que designa cada indivíduo ao seu grupo mais análogo, de acordo com semelhanças na conformação.

Os programas utilizados para as análises de morfometria geométrica estão disponíveis em <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>.

### 3.9.2 Caracterização molecular

#### 3.9.2.1 Espaçador Transcrito Interno (ITS-2)

Para o estudo de variabilidade populacional foram previamente selecionados 19 indivíduos provenientes de diferentes capturas, representativos dos diversos ecótopos e que abrangessem toda a área dos municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho.

A extração de DNA foi realizada a partir de uma pata de cada inseto adulto ou de quinto estágio, conservadas em freezer -70°C, utilizando o Kit de Extração de DNA Genômico Wizard (Promega), segundo Borges *et al.* (2000) (Anexo 3). A pureza e concentração do DNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro a 260 e 280nm.

O protocolo foi estipulado a partir das experiências de Marcilla *et al.* (2001) em estudo de seqüências de DNA ribossomal de diferentes espécies de triatomíneos. O fragmento correspondente a 550 pb da região intergênica ITS-2 do rDNA de cada inseto foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos previamente descritos, *forward* 5`-CTAAGCGGTGGATCACTCGG-3` e *reverse* 5`-GCACTATCAAGCAACACGACTC-3`.

A amplificação por PCR foi realizada com 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 2,5 pmol de cada iniciador e aproximadamente 25 ng de DNA, o volume é completado com água ultra pura para 25µL. A termociclagem consiste em desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 32 ciclos de anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, ao produto é adicionado a sonda EzVision Three 6x (Anresco) e submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. A visualização das bandas é feita em transluminador UV. Os fragmentos de interesse são cortados do gel e purificados utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) conforme recomendações do fabricante. A qualidade e concentração do DNA purificado foram mensuradas em espectrofotômetro, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação de absorbância 260/280nm de comprimento

de onda.

Para a reação de sequenciamento são adicionados 4µL de DYEnamic ET dye terminator reagent premix (MegaBace, Amersham), 5pmol de iniciador *foward* ou *reverse*, 90 ng de DNA e água ultra pura para volume final de 10µL. A reação é realizada em 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. Em seguida, foi realizada a precipitação da placa. A cada poço foi adicionado 1µL de Acetato de Amônio 7,5 M (kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing for MegaBace, Amersham), 30µL de álcool absoluto gelado, agitado em Vortex por 5 segundos, centrifugado a 3.700 rpm por 45 minutos, após remover o sobrenadante, foi adicionado 100µL de etanol 70% gelado, centrifugado a 3.700 rpm por 15 minutos, ao final, a placa foi completamente seca e o precipitado ressuspensionado em 10 µL de solução de ressuspensão (kit DYEnamic ET dye terminator MegaBace, Amersham), agitado novamente em Vortex, protegido da luz e mantido a -20°C.

O sequenciamento foi realizado pela Subunidade de Sequenciamento de DNA de Belo Horizonte da Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ utilizando-se sequenciador MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare).

Foram sequenciadas no mínimo três cópias *fowards* e três cópias *reverse* de cada fragmento para a construção de uma sequência consenso (Phred/Phrap/Consed), dessa forma é possível assegurar a qualidade da análise. As sequências consenso foram alinhadas (programa CLUSTAL-W) e analisadas (programa TREECON).

### 3.9.2.2 Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente (RAPD)

Para a avaliação da variabilidade genética dos insetos procedentes do município de Jaboticatubas, foram selecionados 10 *P. megistus* representantes de todas as capturas no intradomicílio, 22 do peridomicílio (Anexo 4) e dois silvestres, capturados na copa de uma palmeira e como grupo externo, um indivíduo *T. sordida*.

O DNA foi extraído de uma das patas de *P. megistus* utilizando-se o Kit de Extração de DNA Genômico Wizard (Promega) (Borges *et al.* 2000) (Anexo 3).

A técnica de RAPD-PCR foi realizada segundo Borges *et al.* (2000) utilizando-se quatro iniciadores: 3302 (5'-CTGATGCTAC-3'), 3303 (5'-TCACGATGCA-3'), 3304 (5'-AGCATCTGTT-3') e 3307 (5'-AGTGCTACGT-3'). Estes foram selecionados a partir de trabalhos anteriores com *T. brasiliensis* (Borges *et al.* 2000), *P. megistus* (Barbosa *et al.* 2006), *T. pseudomaculata* e *T. maculata* (Belisário 2006), por apresentarem perfis multivariados, com boa definição e maior poder de diferenciação.

Para a amplificação do DNA foi utilizado o Kit Taq DNA Polymerase em tampão de estoque B (Promega, Madison, EI). Para cada 10µl de reação foram utilizados: 1 µL de tampão de reação livre de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 1,0mM EDTA, 1nM DDT, 50% glicerol, 0,5% Tween<sup>®</sup> 20, 0,5% Nonidet<sup>®</sup>-P40); 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM; 1µL de dNTP com 200µM de cada nucleotídeo (Promega, Madison, WI); 1µL de iniciador 12,5pmol, 0,2µL de Taq DNA polimerase 5u/µL de DNA; água q.s.p 10 µL.

A reação de PCR foi realizada com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por três minutos; três ciclos com anelamento a 30°C por dois minutos, extensão a 72°C por um minuto, desnaturação a 95°C por 30 segundos; 34 ciclos com anelamento a 40°C por dois minutos, extensão a 72°C por um minuto, desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento final a 40°C por um minuto; e extensão final a 72°C por cinco minutos.

Para a verificação da amplificação e do controle negativo, os *amplicons* foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em sistema mini-gel (BioRad), e

para a análise entre grupos, em gel de poliacrilamida 6% com 45 canaletas, ambos corados por prata. Em cada canaleta foram aplicados 3 $\mu$ L (mini-gel) e 6 $\mu$ L (gel de 40 canaletas) da reação amplificada acrescida de igual volume de tampão de amostra concentrado duas vezes. Como padrão de tamanho de bandas foi utilizado fragmentos de  $\Phi$ x 174RF DNA/Hae III.

Medidas preventivas foram tomadas para a obtenção de uma amplificação livre de produtos inespecíficos: separação física entre os ambientes para preparo das reações de PCR e o de tratamento de produtos amplificados; adoção de múltiplos controles negativos; mistura prévia dos componentes da reação em um “mix”, diminuindo o número de manipulações nos tubos da reação; submissão dos tubos, ponteiras, pipetas e alíquotas dos componentes de reação à radiação ultravioleta por 20 minutos antes de sua utilização; limpeza rigorosa do local de preparo com hipoclorito e álcool 70%; utilização do mesmo termociclador a fim de evitar as pequenas variações que podem ocorrer entre uma máquina e outra.

A verificação da ocorrência da variabilidade genética, presença e ausência de bandas de cada grupo foram realizadas por inspeção visual, sendo selecionadas bandas bem definidas com fácil distinção a fim de evitar erros de interpretação dos perfis. Para a análise entre os grupos, foi construída uma matriz táxon/caractere a partir da análise dos perfis individuais. Para essa matriz, cada banda foi tratada como um caractere, sua presença ou ausência foi codificada como 1 ou 0, respectivamente. As amostras foram analisadas duas a duas, para determinação do percentual de bandas compartilhadas entre elas e calculado o coeficiente de similaridade de Dice (Dice 1945). Com os dados derivados desta fórmula foi obtida uma matriz de similaridade que foi então utilizada para análise das amostras através de UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis). A linha de fenon marcada no fenograma representa a média das similaridades entre os pares e indica o ponto de referência para divisão dos organismos em grupos separados (Sneath & Sokal 1962, 1973). Esta análise computacional foi realizada com o programa NTSys-pc (versão 2.0).

Os marcadores genéticos RAPDs foram analisados assumindo-se os seguintes pressupostos: os alelos RAPDs segregam em proporções Mendelianas; as bandas de mesmo



tamanho são homólogas; os diferentes loci segregam independentemente; e as populações analisadas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Apostol *et al.* 1996).

### 3.10 Caracterização Molecular das Cepas de *T. cruzi*

Os tripanossomatídeos provenientes dos triatomíneos capturados e dos utilizados no xenodiagnóstico foram identificados quanto ao grupo (I ou II) por PCR *multiplex* espécie-específica utilizando como alvo DNA satélite segundo Liarte *et al.* (2009). Todas as amostras de sangue de reservatórios silvestres coletadas em papel filtro e o sangue obtido de cães positivos para o teste de detecção de tripanossomatídeos foram testadas quanto à infecção por *T. cruzi* utilizando a mesma metodologia.

A PCR *multiplex* foi escolhida por ser altamente sensível e por ser capaz de detectar a presença da infecção com apenas 10fg de DNA de *T. cruzi*, sendo possível o diagnóstico em triatomíneos e reservatórios mesmo quando estes apresentam baixa parasitemia. Entretanto, utilizando essa técnica, não é possível determinar se uma amostra com o padrão denominado *T. cruzi* II é representativo de infecção por uma única cepa ou por infecção mista.

A extração do DNA proveniente de culturas e de papel filtro foi realizada pelo método de lise (Machado *et al.* 2000). A cada amostra, 20µL de cultura ou 2,5cm<sup>2</sup> de papel filtro impregnando com sangue, foi acrescentado 100µL de água deionizada, aquecido a 70°C por 10 minutos e centrifugado por 3 minutos a 14.000rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi estocado a -4°C e utilizado para PCR. A extração de DNA do sangue dos cães está descrita no Anexo 2.

Para a amplificação do DNA pela PCR *multiplex*, foram utilizados simultaneamente os iniciadores Diaz 7 (5`-CGCAAACAGATATTGACAGAG-3`), Diaz 8 (5`-TGTTACACACTGGACACCAA-3`) (Diaz *et al.* 1992), e TcSat 4 (5`-GCAGCCGCTCGAAAATCC-3`) (Liarte *et al.* 2009). Liarte *et al.* (2009) mostraram que esta metodologia é específica para *T. cruzi* e portanto, não amplifica o DNA dos hospedeiros (vertebrados e invertebrados) e nem de outros tripanosomatídeos.

Cada reação de PCR contém tampão de reação (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl; pH 8.4), 1.9 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (200 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos - Promega,

Madison, WI, USA), 5 pmoles de cada iniciador; 0,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 µl do DNA de *T. cruzi*, extraído na etapa anterior. Como controle positivo, foram utilizadas as cepas padrão Colombiana e Y, pertencentes aos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, respectivamente. O ciclo de PCR constituiu-se das seguintes etapas: desnaturação inicial por cinco minutos a 72°C; 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C e 15 segundos a 72°C; e extensão final por cinco minutos a 72°C.

Após a PCR, 3µl do produto foi submetido à análise em gel de poliacrilamida 6% e corado em nitrato de prata 0,2% revelando a presença de bandas específicas: uma banda de 111 pb indicando grupo I, e para o grupo II uma banda adicional de 195 pb.

## **4 Resultados**

---

#### 4.1 Perfil de Infestação das Unidades Domiciliares por *Panstrongylus megistus* no Município de Jaboticatubas

O número de localidades e de unidades domiciliares investigadas por ano pelo PCDCH de Jaboticatubas e as infestadas por triatomíneos estão demonstrados na Tabela VI. Durante todo o estudo foram trabalhadas 159 localidades, estando 44 infestadas por triatomíneos (Figura 17). Três delas (Bom Jardim, Espada e Lapinha) foram positivas em mais de um ciclo, sempre por *P. megistus*.

**Tabela VI** - Número e porcentagem de localidades e unidades domiciliares investigadas pelo PCDCH no município de Jaboticatubas, MG, Brasil, nos anos de 2007 a 2010

Ano	Localidades		Unidades domiciliares	
	investigadas	infestadas	investigadas	infestadas
<b>2007</b>	77 (32,5%)	30 (39,0%)	1.490 (14,1%)	35 (2,3%)
<b>2008</b>	85 (35,9%)	17 (20,0%)	1.767 (16,7%)	16 (0,9%)
<b>2009</b>	83 (35,0%)	23 (27,7%)	1.520 (14,4%)	23 (1,5%)
<b>2010</b>	51 (21,5%)	8 (15,7%)	704 (6,7%)	10 (1,4%)

Em todas as unidades domiciliares a infestação foi comprovada em apenas um local, exceto em uma localizada em São José da Serra, com captura concomitante de triatomíneos no paiol, galinheiro e no quarto. Neste último só foi capturado um inseto adulto, provavelmente invasor originado das colônias extradomiciliares.

Houve reinfestação por *P. megistus* no galinheiro de uma UD da localidade de Vargem Grande cinco meses após a borrifração. Em Laranjeiras II foi observada, um ano após o encontro da primeira colônia, reinfestação de uma mesma unidade domiciliar por *T. sordida* em um galinheiro.

Na Tabela VII estão descritos o número de triatomíneos capturados e de unidades domiciliares positivas para cada espécie a cada ano em Jaboticatubas. Entre 2007 a 2010 foram capturados 613 triatomíneos em 78 unidades domiciliares. *P. megistus* foi a espécie de maior ocorrência, representando 94,3% dos insetos capturados e presente em 88,5% das unidades domiciliares infestadas. Durante o primeiro ano do estudo foram capturados 321 espécimes (52,4%); isso se deve ao encontro de três grandes colônias com um total de 183

triatomíneos: localidade Santo Antônio com 68 indivíduos; Barreiro do Papagaio, 58 indivíduos; e Bioça, 57 indivíduos. Já no ano de 2010, observa-se uma grande diminuição na quantidade de triatomíneos capturados e de unidades domiciliares positivas. Este fato reflete a diminuição das atividades do PCDCH de Jaboticatubas, também constatada na redução de localidades visitadas no mesmo período.

Os índices entomológicos de infestação, densidade, dispersão e infecção de Jaboticatubas estão demonstrados na Tabela VIII. Nenhum exemplar de *T. sordida* estava infectado. No ano de 2010 não houve captura desta espécie.

**Tabela VII** – Número (n) e porcentagem (%) de unidades domiciliares positivas e de triatomíneos capturados no município de Jaboticatubas, MG, no período de 2007 a 2010

C	Unidades domiciliares positivas					Triatomíneos capturados				
	<i>P. megistus</i>		<i>T. sordida</i>		total	<i>P. megistus</i>		<i>T. sordida</i>		total
	n	%	n	%	n	n	%	n	%	n
<b>2007</b>	28	93,3	2	6,7	30	309	96,3	12	3,7	321
<b>2008</b>	16	94,1	2	11,8	17	122	98,4	2	1,6	124
<b>2009</b>	17	73,9	6	26,1	23	103	83,1	21	16,9	124
<b>2010</b>	8	100,0	0	0,0	8	44	100,0	0	0,0	44
<b>total</b>	<b>69</b>	<b>88,3</b>	<b>9</b>	<b>11,7</b>	<b>77</b>	<b>578</b>	<b>94,3</b>	<b>35</b>	<b>5,7</b>	<b>613</b>

**Tabela VIII** – Índices entomológicos por espécie e totais do PCDCH no município de Jaboticatubas, MG, no período de 2007 a 2010

Ano	Espécie	Índices entomológicos			
		infestação	densidade	dispersão	infecção
<b>2007</b>	<i>P. megistus</i>	2,2	6,5	35,1	2,0
	<i>T. sordida</i>	0,1	6,0	2,6	0,0
	<b>total</b>	<b>2,3</b>	<b>6,4</b>	<b>36,4</b>	<b>1,8</b>
<b>2008</b>	<i>P. megistus</i>	0,8	7,6	14,1	1,6
	<i>T. sordida</i>	0,1	0,1	2,4	0,0
	<b>total</b>	<b>0,9</b>	<b>7,8</b>	<b>15,3</b>	<b>1,7</b>
<b>2009</b>	<i>P. megistus</i>	1,1	6,4	18,1	0,0
	<i>T. sordida</i>	0,5	3,9	7,2	0,0
	<b>total</b>	<b>1,5</b>	<b>5,8</b>	<b>24,1</b>	<b>0,0</b>
<b>2010</b>	<i>P. megistus</i>	1,4	4,4	15,7	0,0
	<i>T. sordida</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>total</b>	<b>1,4</b>	<b>4,4</b>	<b>15,7</b>	<b>0,0</b>
<b>2007 a 2010</b>		<b>1,5</b>	<b>6,1</b>	<b>22,9</b>	<b>1,1</b>

A grande maioria dos exemplares de *P. megistus* foi encontrada no peridomicílio

(92%), onde foram capturados 400 indivíduos. O maior número de indivíduos foi coletado nos galinheiros (59,5%), seguido do paiol (16,6%), e um depósito, com o achado de uma grande colônia com 68 indivíduos, associada a ninhos de galinhas. No intradomicílio, o maior número de insetos foi capturado no quarto. Foram evidenciadas colônias (presença de ninfas) de *P. megistus* principalmente nos galinheiros e nos quartos (Tabela IX).

**Tabela IX** - Número (n) e porcentagem (%) de ninfas e adultos de *Panstrongylus megistus* capturados por ecótopo e colonização no município de Jaboticatubas no período de setembro de 2007 a setembro de 2010

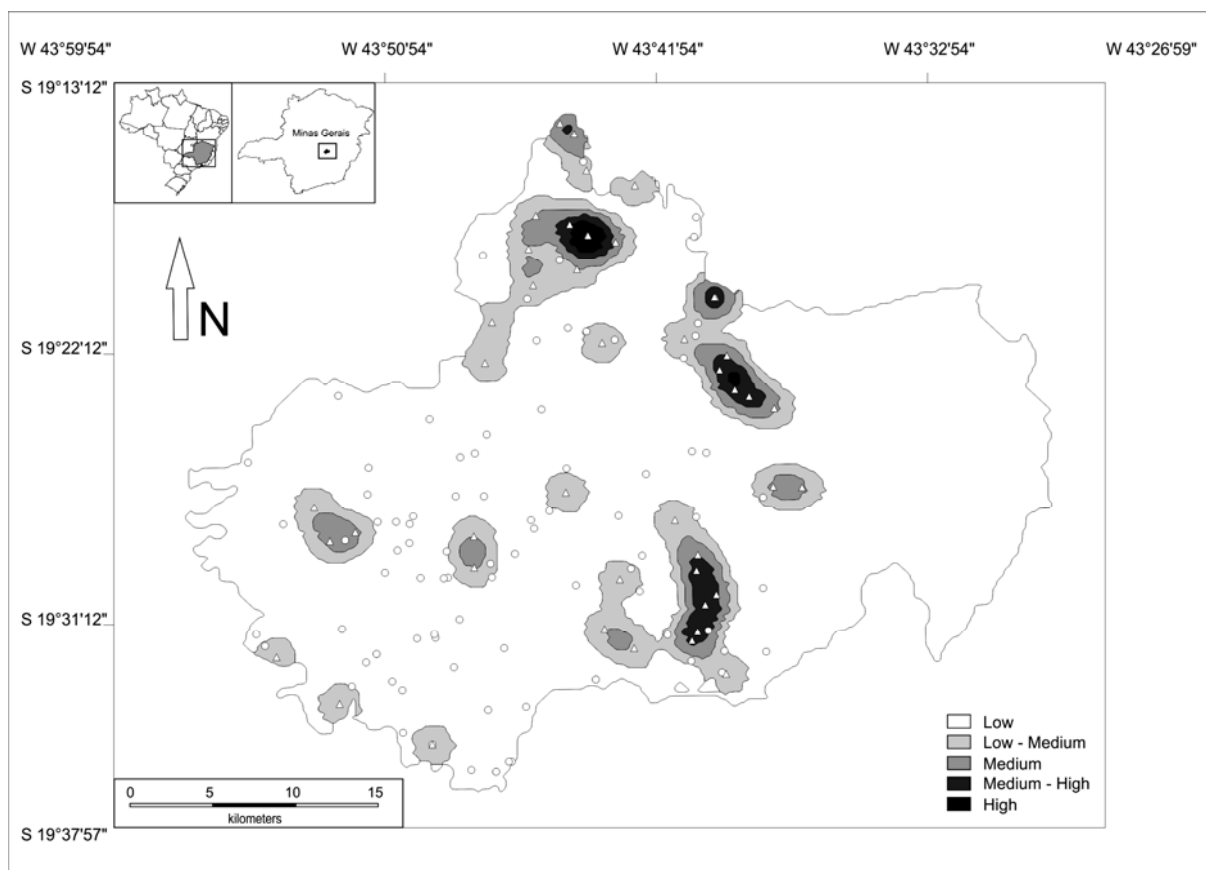
ecótopo		triatomíneos capturados						ecótopos infestados			
		ninfas		adultos		total		com ninfas		total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
peridomicílio	galinheiro	152	64,1	107	54	259	59,5	28	77,8	36	70,6
	paiol	52	21,9	20	10,1	72	16,6	3	100	3	5,9
	depósito	7	3	61	30,8	68	15,6	1	100	1	2
	outros	1	0,4	0	0	1	0,2	1	100	1	2
	<b>total</b>	<b>212</b>	<b>89,5</b>	<b>188</b>	<b>94,9</b>	<b>400</b>	<b>92</b>	<b>33</b>	<b>80,5</b>	<b>41</b>	<b>80,4</b>
intra-domicílio	quarto	25	10,5	9	4,5	34	7,8	6	66,7	9	17,6
	sala	0	0	1	0,5	1	0,2	0	0	1	2
	<b>total</b>	<b>25</b>	<b>10,5</b>	<b>10</b>	<b>5,1</b>	<b>35</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>60</b>	<b>10</b>	<b>19,6</b>
<b>total</b>		<b>237</b>	<b>54,5</b>	<b>198</b>	<b>45,5</b>	<b>435</b>	<b>100</b>	<b>39</b>	<b>76,5</b>	<b>51</b>	<b>100</b>

O anexo 4 detalha informações (localidade, número e espécies de triatomíneos, data, e coordenada) das capturas realizadas no período de setembro de 2007 a setembro de 2010, cujos triatomíneos foram encaminhados ao Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas.

Em relação às características das casas, a maioria (94,1%, n=48) apresentava paredes de alvenaria com reboco, e somente três (5,9%) possuíam parede de barro com reboco. Em todas as unidades domiciliares analisadas o telhado era de telha.

## 4.2 Análise espacial

As áreas com maior ocorrência de localidades positivas concentraram-se principalmente em três regiões, uma ao norte e duas na porção centro-oriental do município (Figura 17). O leste do município corresponde a área do ParnaCipó, e portanto, é desabitado.



**Figura 17** – Mapa da distribuição de Kernel para localidades infestadas por *P. megistus* em Jaboticatubas no período de 2007 a 2010. ○ = localidades não infestadas; ▲ = localidades infestadas



### 4.3 Captura de Triatomíneos no Ambiente Artificial do Município de Santana do Riacho

No município de Santana do Riacho as capturas decorreram em atendimento às notificações dos moradores junto aos PITs, quando a população encaminha triatomíneos aos postos de atendimento e, posteriormente, os agentes fazem a busca nas UD's seguida da borrifação com inseticida das mesmas. Outros triatomíneos foram encaminhados pelos moradores à coordenadora deste estudo. Esse contexto demonstra que não há a busca sistematizada por triatomíneos nas localidades desse município.

Foram capturados 84 triatomíneos em 22 UD's de 10 (8,4%) localidades de Santana do Riacho. A maior diversidade de espécies capturadas foi observada neste município: *P. megistus*, *T. sordida*, *P. diasi* e *T. vitticeps*. *P. megistus* foi a espécie mais abundante e a única com captura de ninfas (Tabela X).

**Tabela X** – Espécies e número de triatomíneos capturados no município de Santana do Riacho no período de setembro de 2007 a setembro de 2010

espécie	ninfas	adultos	total (%)
<i>Panstrongylus megistus</i>	34	45	79 (94,0)
<i>Triatoma sordida</i>	0	3	3 (3,6)
<i>Panstrongylus diasi</i>	0	1	1 (1,2)
<i>Triatoma vitticeps</i>	0	1	1 (1,2)
<b>total</b>	34	50	84

A maioria dos exemplares de *P. megistus* foi capturada no peridomicílio (77,2%), sendo que nos galinheiros foram capturados 53,2% dos espécimes, seguido do paiol (15,2%). No intradomicílio, o maior número de indivíduos foi capturado no quarto. Das 22 capturas, 54,5% foram realizadas no peridomicílio, e os ecótopos com maior frequência de triatomíneos foram o galinheiro (36,4%), o quarto (27,3%), o paiol e a sala (ambos com 9,1%). Os galinheiros e quartos também foram os ambientes em que foi observada maior colonização (Tabela XI).

**Tabela XI** - Número (n) e porcentagem (%) de ninfas e adultos de *Panstrongylus megistus* capturados por ecótopo e colonização no município de Santana do Riacho no período de setembro de 2007 a setembro de 2010

ecótopo		triatomíneos capturados						ecótopos infestados			
		ninfas		adultos		total		com ninfas		total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
peridomicílio	galinheiro	22	64,7	20	44,4	42	53,2	5	45,5	8	36,4
	paio	5	14,7	7	15,6	12	15,2	1	9,1	2	9,1
	depósito	1	2,9	5	11,1	6	7,6	1	9,1	1	4,5
	não determinado	0	0,0	1	2,2	1	1,3	0	0,0	1	4,5
	<b>total</b>	<b>28</b>	<b>82,4</b>	<b>33</b>	<b>73,3</b>	<b>61</b>	<b>77,2</b>	<b>7</b>	<b>63,6</b>	<b>12</b>	<b>54,5</b>
intradomicílio	quarto	4	11,8	7	15,6	11	13,9	3	27,3	6	27,3
	cozinha	0	0,0	1	2,2	1	1,3	0	0,0	1	4,5
	sala	1	2,9	1	2,2	2	2,5	1	9,1	2	9,1
	não determinado	1	2,9	3	6,7	4	5,1	0	0,0	1	4,5
	<b>total</b>	<b>6</b>	<b>17,6</b>	<b>12</b>	<b>26,7</b>	<b>18</b>	<b>22,8</b>	<b>4</b>	<b>36,4</b>	<b>10</b>	<b>45,5</b>
<b>total</b>	<b>34</b>	<b>43,0</b>	<b>45</b>	<b>57,0</b>	<b>79</b>	<b>100,0</b>	<b>11</b>	<b>50,0</b>	<b>22</b>	<b>100,0</b>	

Em três ocasiões foram capturados *P. megistus* em uma mesma casa na localidade da Serra do Cipó. No ano de 2007 foi capturada uma ninfa no quarto e um adulto na cozinha, em 2010 foi encontrado um adulto na sala. Apesar dos três encontros, a casa não foi borrifada e nem recebeu visita do PCDCH de Santana do Riacho. Em Serra Morena também foi observada a reinfestação por *P. megistus*, em 2007 foi capturado um adulto na parede externa de uma construção, e em 2009 foi encontrada uma colônia no galinheiro próximo ao primeiro local de encontro.

Foi verificada a presença de tripanosomatídeos em dois exemplares adultos de *P. megistus* capturados nas localidades de Curral Queimado e Laranjeiras do município de Santana do Riacho.

As três outras espécies capturadas em Santana do Riacho são consideradas de importância epidemiológica secundária na transmissão da DC, todos os indivíduos eram adultos, foram capturados no intradomicílio e não apresentavam infecção por *T. cruzi*. Os três exemplares de *T. sordida* foram encontrados em duas ocasiões, uma no ano de 2008 e outra em 2009, no quarto de uma UD da localidade de Cipó Abaixo. Um exemplar de *P. diasi* e um de *T. vitticeps* foram encontrados na sala de habitações das localidades do Fundo do Saco e Rio de Pedras, respectivamente. Informações detalhadas das capturas estão descritas no

anexo 5.

Todas as habitações com captura de triatomíneos possuíam cobertura de telha, a maioria apresentava estrutura de alvenaria com reboco, apenas 5 (21,7%), barro com reboco.

#### 4.4 Busca de Triatomíneos no Ambiente Natural dos Municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho

As armadilhas de Noireau capturaram triatomíneos em apenas duas palmeiras do Engenho, Santana do Riacho. Todos os exemplares eram *R. neglectus* e estavam negativos para *T. cruzi* (Tabela XII).

**Tabela XII** – Número e porcentagem de armadilhas de Noireau e palmeiras infestadas e triatomíneos capturados em pesquisas no ambiente silvestre dos municípios de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (SR)

município	localidade/ coordenadas	armadilhas		triatomíneos capturados
		Noireau positivas	palmeiras infestadas	
Jabo	Sede do ParnaCipó	0	X	0
SR	Engenho (Lapa)	0	1 (25%)	1 <i>R. neglectus</i>
SR	Serra Morena	0	X	0
SR	Jerônimo	0	1 (50%)	7 <i>R. neglectus</i>
SR	Engenho (mata)	3 (6%)	1 (25%)	4 <i>R. neglectus</i>
Jabo	Espada	0	X	0
Jabo	Capão dos Moreiras	0	X	0
Jabo	São José da Serra	0	X	0
Jabo	Lapinha	0	X	0
Jabo	Felipe	0	X	0
Jabo	Bom Jardim – faz.	0	X	0
Jabo	Guarazinho	0	X	0
Jabo	Terra Vermelha	0	X	0
Jabo	Juá II	0	X	0
Jabo	Campo Grande II	0	X	0
Jabo	Lapinha	X	1 (33%)	1 <i>R. neglectus</i>
Jabo	Vargem Grande	X	2 (66%)	1 <i>T. sordida</i> 2 <i>R. neglectus</i>
Jabo	São José da Serra	X	2 (100%)	3 <i>R. neglectus</i>
Jabo	Campo Grande II	X	2 (100%)	10 <i>P. megistus</i> 1 <i>R. neglectus</i>
Jabo	Bom Jardim – faz.	X	0	0

Nenhum triatomíneo foi atraído pelas armadilhas luminosas montadas nos trabalhos de campo realizados no município de Santana do Riacho.

Em Santana do Riacho foram dissecadas 11 palmeiras de macaúba (*Acrocomia aculeata* Jacquin 1763) em duas localidades: Engenho e Jerônimo. A primeira integra o

ParnaCipó, onde foram derrubadas nove palmeiras. Em uma delas foi capturado um adulto e em outra uma ninfa de *R. neglectus* de primeiro estágio (Tabela XII). Nesta última também foi encontrado um ninho de ave. O exame a fresco das fezes dos dois triatomíneos foi negativo para *T. cruzi*.

Na localidade Jerônimo, duas macaúbas foram dissecadas no peridomicílio de uma UD, uma apresentou-se infestada por *R. neglectus* (Tabela XII); dos sete triatomíneos capturados, um estava infectado por tripanossomatídeo. Nesta palmeira foi encontrado um ninho com filhote de *Columbidae* (pomba verdadeira, juriti).

Em Jaboticatubas, para a investigação de palmeiras através da dissecação, foram selecionadas cinco UDs que se apresentaram positivas para triatomíneos de diferentes localidades. Nesses trabalhos de campo, realizados no período de 11 a 15 de abril de 2011, foram investigadas 13 palmeiras, em sete foram capturados triatomíneos de três espécies: *R. neglectus*, *T. sordida* e *P. megistus* (Tabela XII).

Na localidade Lapinha foram dissecadas três palmeiras, em uma foi capturado um *R. neglectus* macho infectado por *T. cruzi*. Nesta mesma palmeira foi observada a presença de uma cuíca (*Marmosops incanus*). Em Vargem Grande, onde foram derrubadas três macaúbas localizadas em pastos, em uma foi encontrado um macho de *R. neglectus*, e em outra, uma fêmea de *T. sordida* e também um macho de *R. neglectus*, todos os exemplares foram positivos ao exame parasitológico. Em São José da Serra, as duas macaubeiras investigadas estavam infestadas por ninfas de *R. neglectus*. Dois exemplares foram examinados e não estavam infectados. Campo Grande foi a localidade onde foram capturados os *P. megistus* silvestres. As duas palmeiras dissecadas estavam na borda de um fragmento de mata ciliar (Figura 18), em uma foram capturados duas fêmeas e oito ninfas de *P. megistus*, dos quais três estavam positivos para *T. cruzi*. Na mesma palmeira estavam coabitando alguns roedores (Figura 19). Na outra palmeira investigada em Campo Grande, foi capturada uma ninfa de terceiro estágio de *R. neglectus* que chegou morta ao laboratório, não sendo possível o seu exame parasitológico. A última localidade foi Bom Jardim, onde não foram encontrados triatomíneos nas três macaúbas dissecadas.



**Figura 18** – Localização de palmeira onde foi encontrada a colônia de *Panstrongylus megistus*, na borda de mata da localidade Campo Grande II, Jaboticatubas, MG



**Figura 19** – Roedor encontrado na palmeira de macaúba infestada por *Panstrongylus megistus* na localidade Campo Grande, Jaboticatubas

Os dados de infestação, densidade e infecção das capturas de triatomíneos realizadas pela dissecação de 23 palmeiras estão descritos na tabela XIII.

**Tabela XIII** – Infestação, densidade\* populacional e infecção de triatomíneos capturados pela dissecação de palmeiras nos municípios de Santana do Riacho e Jaboticatubas, MG

	<i>R. neglectus</i>	<i>P. megistus</i>	<i>T. sordida</i>	total
palmeiras infestadas	9 (34,7%)	1 (4%)	1 (4%)	10 (43.5%)
densidade populacional	2,1	10	1	3
infecção	8,22	33,3	100	28,6

\*número de triatomíneos/número de palmeiras infestadas

#### 4.5 Reservatórios Silvestres

Foram capturados mamíferos silvestres em 23% das 456 armadilhas utilizadas. Os mamíferos mais capturados foram os roedores (57%), seguidos dos marsupiais (Tabela XIV).

**Tabela XIV** - Mamíferos capturados em ambientes silvestre dos municípios de Santana do Riacho (SR) e Jaboticatubas (Jabo), MG

município	localidade	marsupiais	roedores	outros	total
Jabo	Sede do ParnaCipó	2	0	1	3
SR	Engenho (Lapa)	2 (1)	19	1	22
SR	Serra Morena	2	0	0	2
SR	Jerônimo	7 (3)	0	0	7
SR	Engenho (mata)	2	1	0	3
Jabo	Espada	0	10	0	10
Jabo	Capão dos Moreiras	1	1	0	2
Jabo	São José da Serra	4	3	0	7
Jabo	Lapinha	5	9	0	14
Jabo	Felipe	2	5	0	7
Jabo	Bom Jardim – faz.	2	3	0	5
Jabo	Guarazinho	2	6	0	8
Jabo	Terra Vermelha	1 (1)	1	0	2
Jabo	Juá II	4 (2)	0	0	4
Jabo	Campo Grande II	7	2	0	9
<b>total</b>		<b>43</b>	<b>60</b>	<b>2*</b>	<b>105</b>

\* um coelho e um morcego

Os números entre parênteses indicam a quantidade de mamíferos infectados por *T. cruzi*.

Na localidade do Engenho, Santana do Riacho, foram investigadas duas regiões adjacentes. Na primeira, as armadilhas foram montadas em uma lapa, onde foi capturado grande número de roedores (31,7% do total). Na segunda oportunidade, foi investigada uma área de mata ciliar onde foram capturados somente três animais (dois marsupiais e um

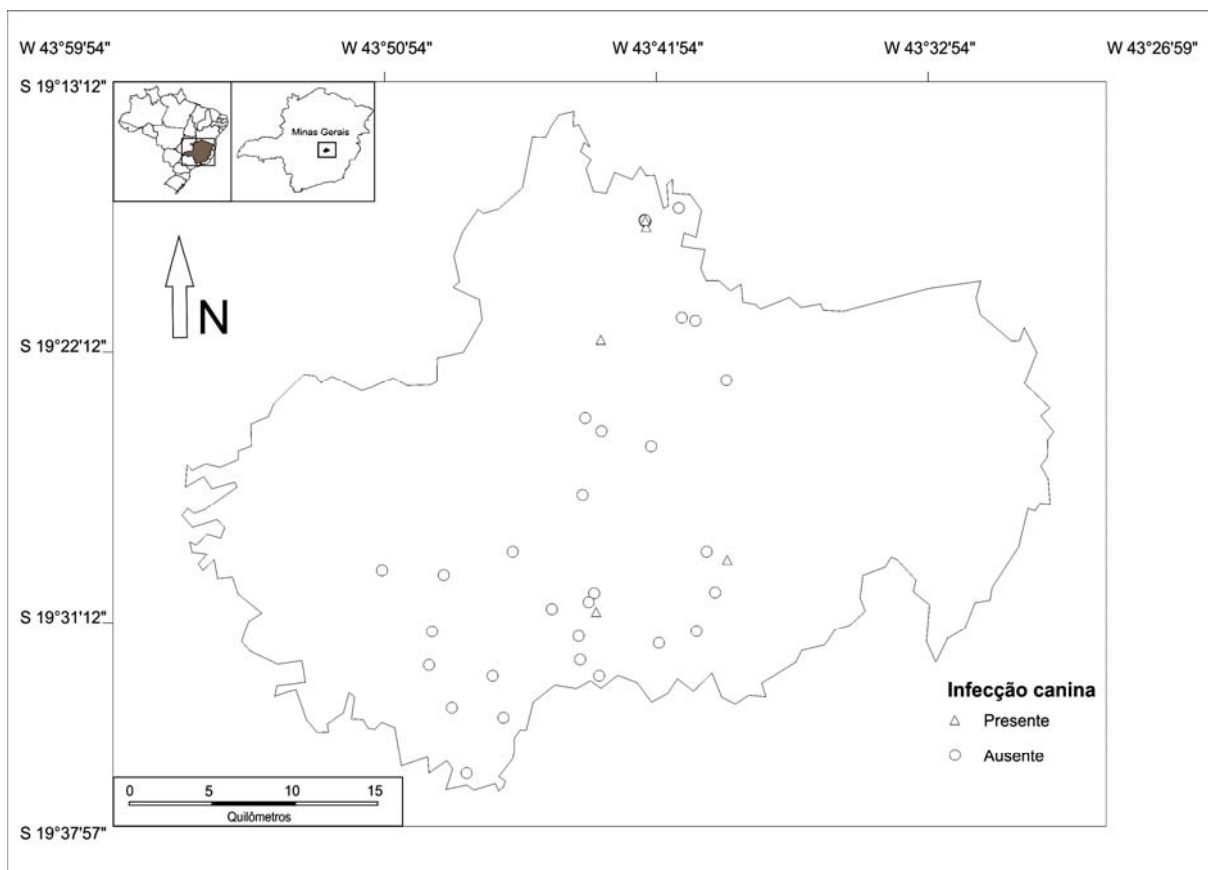


roedor) em quatro dias de trabalho.

Os exames do xenodiagnóstico foram positivos para uma cuíca e dois gambás capturados na localidade Jerônimo, representando índice de infecção de 43% para os marsupiais dessa região. Dentre os mamíferos capturados no Engenho, um gambá (33%) teve o xenodiagnóstico positivo. A avaliação por PCR *multiplex* das amostras de sangue de reservatórios silvestres impregnadas em papel filtro, e que foram negativas para o xenodiagnóstico, revelou infecção em um gambá de Terra Vermelha e dois de Juá II. As taxas de infecção para estas duas localidades são de 50%, se avaliados todos os mamíferos examinados neste estudo o índice de infecção é de 6,7%, e dentre os marsupiais de 16,3%.

#### 4.6 Reservatório Doméstico - Cães

Os soros de cinco (2,4%) dos 206 cães amostrados apresentaram-se positivos para o Teste Rápido de Detecção de *T. cruzi* em cães. As amostras foram testadas molecularmente por PCR-*multiplex* e confirmada a infecção (item 4.7). Quatro dos cães positivos são de localidades com ocorrência de triatomíneos, Bom Jardim, Vargem Grande, Espada e Matição. Surpreendente foi o encontro de um cão positivo no bairro União da Serra na área urbana de Jaboticatubas. A distribuição das localidades de origem dos cães examinados positivos e negativos está demonstrada na Figura 20.

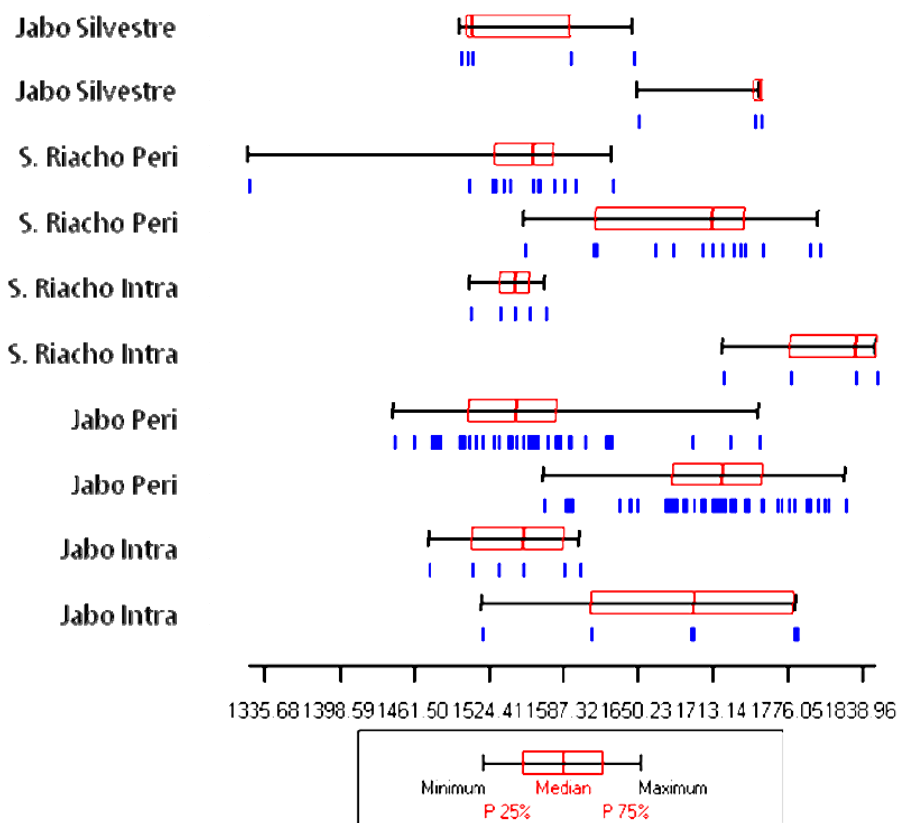


**Figura 20** – Distribuição das localidades de origem de cães examinados quanto à infecção por *T. cruzi* em Jaboticatubas, MG, nos anos de 2009 e 2010

## 4.7 Caracterização dos triatomíneos capturados

### 4.7.1 Morfometria Geométrica

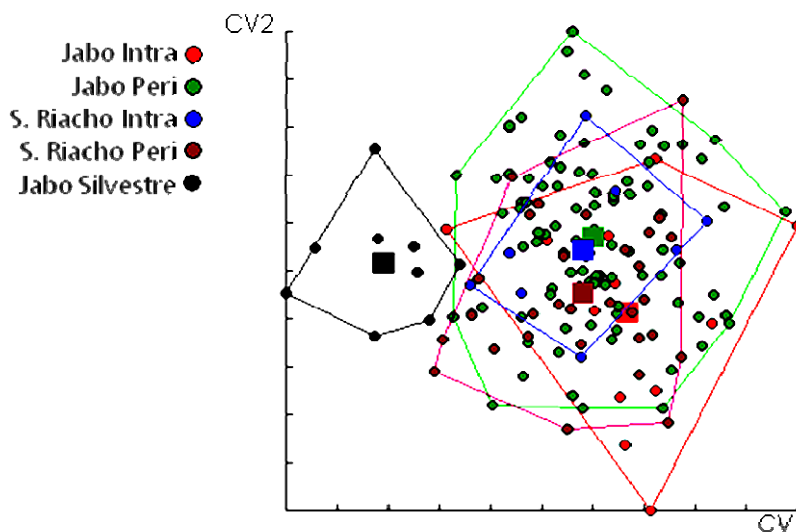
A análise estatística do tamanho centroide revelou dimorfismo sexual em todos os grupos, sendo as fêmeas maiores que os machos ( $p < 0,05$ ) (Figura 21). Quando comparados os grupos, independentemente do sexo, não foi observada nenhuma diferença significativa de tamanho ( $p > 0,05$ ).



**Figura 21-** Tamanho centroide das asas de fêmeas (♀) e machos (♂) de *Panstrongylus megistus* do intradomicílio (Intra), peridomicílio (Peri) e ambiente silvestre dos municípios de Santana do Riacho (S. Riacho) e Jaboticatubas (Jabo), MG. As barras em azul representam os indivíduos e as caixas vermelhas os percentis 25% e 75%

A primeira variável canônica da análise discriminante contribuiu com 30% e a segunda com 17% da variação total de conformação. O mapa fatorial obtido separa o grupo constituído pelos indivíduos do ambiente natural pela primeira variável canônica. Os demais

grupos apresentaram-se sobrepostos (Figura 22). As amostras do intradomicílio e peridomicílio de Jaboticatubas foram as que apresentaram maior variabilidade, e as que apresentaram menor variabilidade de conformação foram as do intradomicílio de Santana do Riacho e do ambiente silvestre de Jaboticatubas.



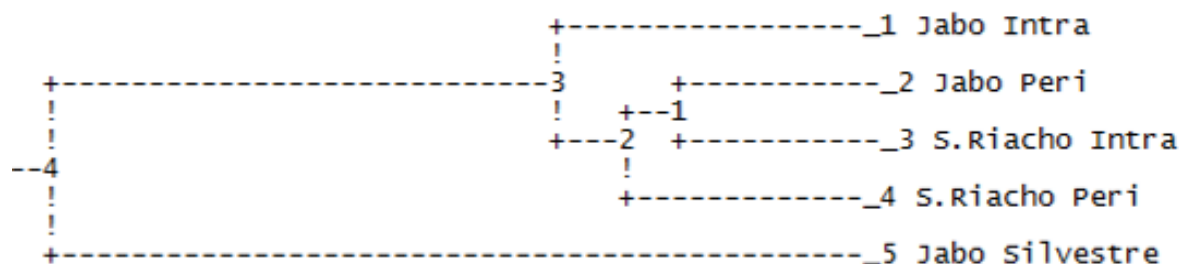
**Figura 22-** Mapa fatorial da primeira (CV1) e segunda (CV2) variáveis canônicas da análise discriminante da variação total de conformação de *Panstrongylus megistus* procedentes do intradomicílio (Intra), peridomicílio (Peri) e ambiente silvestre dos municípios de Santana do Riacho (S. do Riacho) e Jaboticatubas (Jabo)

A distância de Mahalanobis das variáveis de conformação foi maior entre os grupos do peridomicílio e silvestre de Jaboticatubas (3,55), e menor entre o peridomicílio de Jaboticatubas com o intradomicílio (0,78) e peridomicílio (0,79) de Santana do Riacho. O teste de permutação revelou diferença significativa ( $p < 0,005$ ) somente na distância do grupo silvestre com os demais (Tabela XV). O fenograma das distâncias de Mahalanobis ilustra essa diferenciação (Figura 23).

A taxa de reclassificação foi de 100% para os indivíduos procedentes do ambiente silvestre de Jaboticatubas, indicando grande estruturação/ diferenciação populacional desse grupo. As menores reclassificações foram observadas para os indivíduos procedentes do peridomicílio, que poderiam ser reclassificados tanto com os grupos do intradomicílio, quanto dos silvestres (Tabela XVI).

**Tabela XV** – Distâncias de Mahalanobis (acima) e suas significâncias (abaixo) entre os grupos de *Panstrongylus megistus* provenientes do intradomicílio (Intra) e peridomicílio (Peri) de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (SR), e do ambiente silvestre (Silv) de Jaboticatubas

Grupos	Jabo Intra	Jabo Peri	SR Intra	SR Peri	Jabo Silv
Jabo Intra		1.20	1.23	1.15	3.55
Jabo Peri	0.076200		0.78	0.79	3.01
SR Intra	0.493100	0.771600		1.08	2.93
SR Peri	0.225500	0.105900	0.473200		2.91
Jabo Silv	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	



**Figura 23** - Árvore UPGMA das Distâncias de Mahalanobis de *Panstrongylus megistus* procedentes do intradomicílio (Intra) e peridomicílio (Peri) dos municípios de Jaboticatubas (Jabo) e Santana do Riacho (S. Riacho), e do ambiente silvestre de Jaboticatubas

**Tabela XVI**- Taxa de reclassificação de *Panstrongylus megistus* provenientes do peridomicílio e intradomicílio dos municípios de Jaboticatubas e Santana do Riacho

Município	Ecótopo	Número de indivíduos		Taxa de reclassificação
		Total	Reclassificados	
Jaboticatubas	Intradomicílio	12	8	66 %
	Peridomicílio	91	30	32 %
	Silvestre	9	9	100%
Santana do Riacho	Intradomicílio	9	5	55 %
	Peridomicílio	30	10	33 %

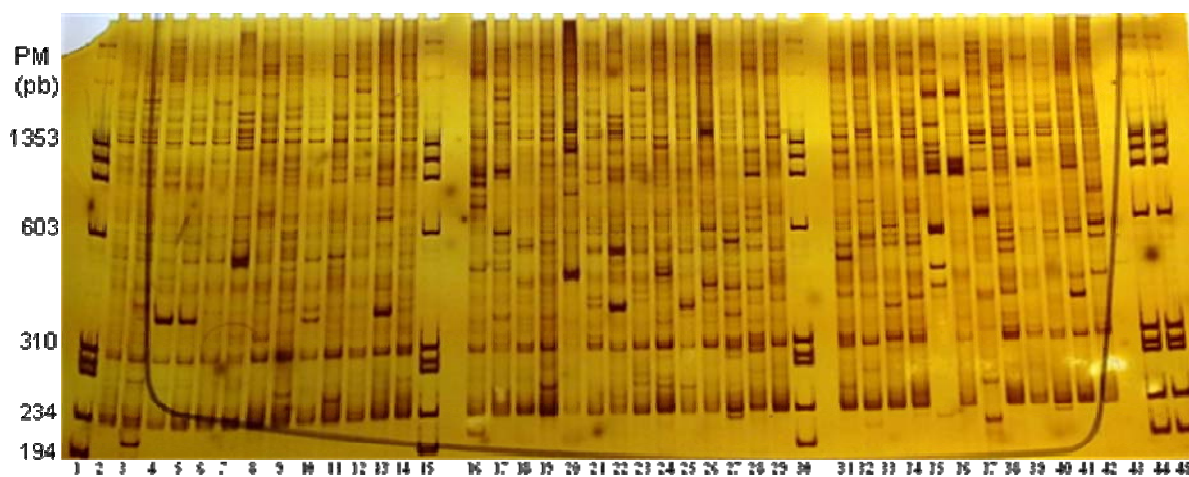
O teste de regressão multivariada entre as variáveis de conformação (*partial warps*) e o tamanho centroide revelou a existência de resíduo alométrico na análise de conformação ( $p=0$ ). Entretanto, a regressão entre as variáveis construídas sob as hipóteses do resíduo alométrico ser diferente (*different slope*) ou igual (*common slope*) entre as amostras ( $p=0,41$ ), demonstrou que o resíduo é igual em todos os grupos, dessa forma, não influencia a análise de conformação obtida.

#### **4.7.2 Espaçadores Transcritos Internos – ITS-2**

Os blast-n (NCBI) realizados com as sequências consenso (Anexo 6) apresentaram similaridade variando de 96 a 100% com as sequências depositadas no banco de sequências nucleotídicas, demonstrando a qualidade das mesmas e baixa variabilidade. Este último fato impossibilitou a realização do estudo populacional utilizando a região intergênica ITS-2, visto que, para tais estudos se buscam marcadores genéticos com altas taxas de polimorfismo. Como consequência, foi selecionada outra técnica mais sensível, os RAPDs.

### 4.7.3 Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente – RAPD

Foram analisadas 144 bandas entre 230 a 800 pares de bases para os quatro iniciadores utilizados (Figura 24). Cada indivíduo apresentou um perfil de RAPD único, sendo que o coeficiente de similaridade de Dice variou de 0,28 a 0,72 entre os *P. megistus*, esses valores refletem a porcentagem de bandas compartilhadas entre grupos ou indivíduos, demonstrando que a variabilidade genética dos *P. megistus* capturados em Jaboticatubas é grande. A linha de fenon revelou quatro grupos: 1) *T. sordida* (grupo externo); 2) indivíduo procedente do peridomicílio de uma UD da localidade Alto Geraldo Correia; 3) pelos indivíduos do peridomicílio de Capão dos Moreiras e José Dias e; 4) pelas demais amostras (Figura 25).



**Figura 24** – Perfis de RAPD gerados pelo iniciador 3302 visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata. Canaletas **1, 15, 30, 44 e 45**: padrão de peso molecular (PM); canaleta 43: controle negativo

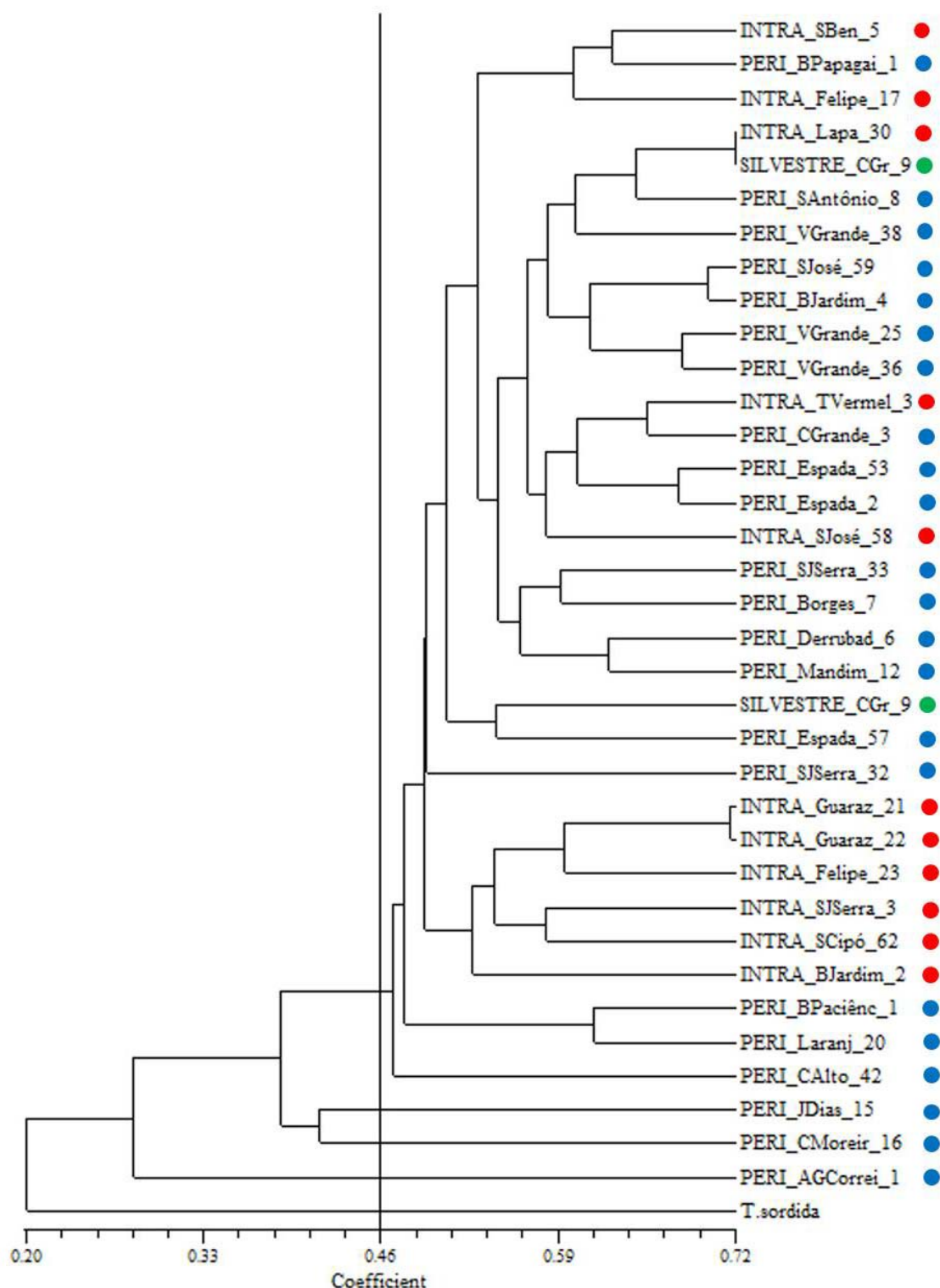
No grupo maior pode-se observar um *cluster* com a maioria das amostras procedentes do intradomicílio, independentemente se encontradas formas imaturas (colonização) ou somente adultas. Os indivíduos que se apresentaram mais semelhantes (72% de bandas compartilhadas) foram um *P. megistus* capturado em uma colônia do intradomicílio de uma UD da localidade Lapa e um exemplar silvestre capturado em uma localidade próxima, Capão Grande (Figura 26). O outro exemplar de *P. megistus* silvestre agrupou com um exemplar capturado no peridomicílio da localidade Espada, localizada no outro extremo do município (norte). Deve-se considerar que, embora os exemplares silvestres tenham sido capturados em uma mesma palmeira, não se mostraram muito



semelhantes geneticamente (Figura 25), sendo mais diferentes entre si que dos exemplares de outra origem.

Na localidade Espada foram incluídas amostras de capturas realizadas em anos diferentes no peridomicílio de três UD's. Indivíduos de duas casas vizinhas agruparam-se no fenograma. Amostras de duas casas próximas na localidade de Guarazinho também se apresentaram muito semelhantes. Em Felipe, *P. megistus* capturados no mesmo ano em diferentes UD's não se agruparam. O mesmo pode ser observado quando analisados *P. megistus* capturados no galinheiro, paiol e quarto de uma UD de São José da Serra (Figura 25).

Um indivíduo capturado no intradomicílio de uma localidade de São José não agrupou com os demais deste ecótopo, podendo indicar um processo de colonização recente (Figura 25).



**Figura 25** - Fenograma construído a partir da matriz de presença e ausência de caracteres obtidos pela análise de RAPDs utilizando o coeficiente de associação de Dice e UPGMA. A linha vertical representa a linha de fenon; **SILVESTRE** (verde); **PERI**= peridomicílio (azul); **INTRA**= intradomicílio (vermelho); seguidos dos nomes das localidades de origem: **SBen**= São Benedito, **BPapagai**= Barreiro do Papagaio, **CGr** e **CGrande**= Capão Grande, **SAntônio**= Santo Antônio, **VGrande**= Vargem Grande, **SJosé**= São José, **BJardim**= Bom Jardim, **TVermel**= Terra Vermelha, **SJSerra**= São José da Serra, **Derrubad**= Derrubada, **Guaraz**= Guarazinho, **SCipó**= Serra do Cipó, **BPaciênc**= Barreiro da Paciência, **Laranj**= Laranjeiras, **CAlto**= Capão Alto, **JDias**= José Dias, **CMoreir**= Capão Moreiras, **AGCorrei**= Alto Geraldo Corrêa

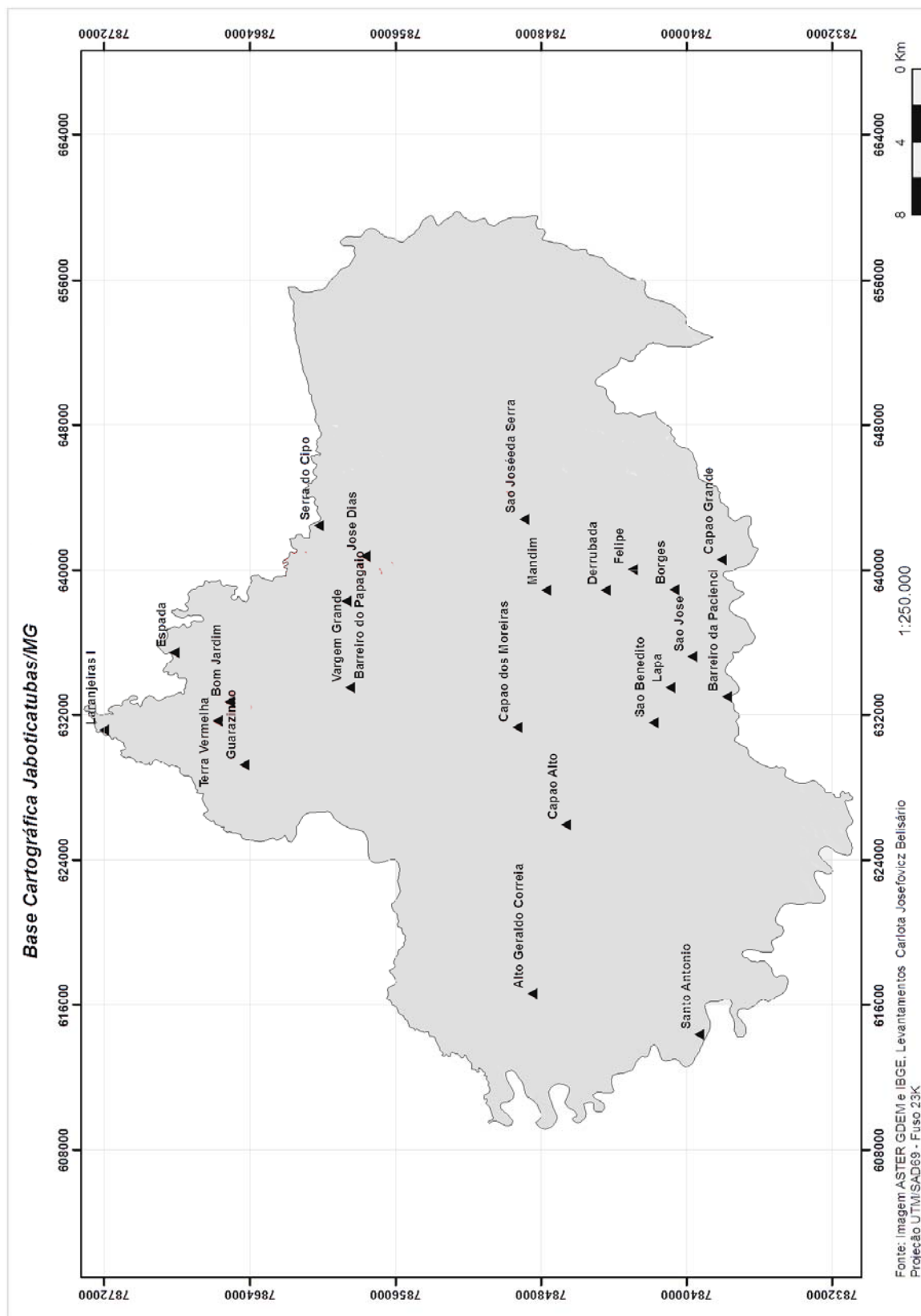


Figura 26 – Mapa do município de Jaboticatubas com as localidades de origem dos *Panstrongylus megistus* utilizados na análise de RAPD

#### 4.8 Caracterização Molecular das Cepas de *T. cruzi*

As amostras testadas por PCR *multiplex* e seus resultados estão descritos na tabela XVII.

**Tabela XVII** – Descrição da origem dos *Trypanosoma cruzi* isolados em Jaboticatubas e Santana do Riacho e caracterizados molecularmente

fonte	localidade / município	ecótopo	material	classificação
<i>P. megistus</i>	São Benedito, Jaboticatubas	intradomicílio	fezes em papel filtro	<i>T. cruzi</i> I
<i>P. megistus</i>	Buraco, Jaboticatubas	peridomicílio	fezes em papel filtro	<i>T. cruzi</i> I
<i>P. megistus</i>	Felipe, Jaboticatubas	intradomicílio	fezes em papel filtro	<i>T. cruzi</i> II
<i>P. megistus</i>	Laranjeiras, Santana do Riacho	peridomicílio	fezes em papel filtro	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. sordida</i>	Vargem Grande, Jaboticatubas	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
<i>R. neglectus</i>	Lapinha, Jaboticatubas	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
<i>P. megistus</i>	Capão Grande, Jaboticatubas	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
<i>P. megistus</i>	Capão Grande, Jaboticatubas	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
<i>P. megistus</i>	Capão Grande, Jaboticatubas	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
cão	Bom Jardim, Jaboticatubas	doméstico	sangue	<i>T. cruzi</i> I
cão	Vargem Grande, Jaboticatubas	doméstico	sangue	<i>T. cruzi</i> I
cão	Espada, Jaboticatubas	doméstico	sangue	<i>T. cruzi</i> I
cão	Maiçã, Jaboticatubas	doméstico	sangue	<i>T. cruzi</i> I
cão	União da Serra, Jaboticatubas	doméstico	sangue	<i>T. cruzi</i> I
gambá	Juá II, Jaboticatubas	silvestre	sangue em papel filtro	<i>T. cruzi</i> I
gambá	Juá II, Jaboticatubas	silvestre	sangue em papel filtro	<i>T. cruzi</i> I
gambá	Terra Vermelha, Jaboticatubas	silvestre	sangue em papel filtro	<i>T. cruzi</i> I
Cuíca	Jerônimo, Santana do Riacho	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
Gambá	Jerônimo, Santana do Riacho	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
Gambá	Jerônimo, Santana do Riacho	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I
Gambá	Engenho, Santana do Riacho	silvestre	cultura	<i>T. cruzi</i> I

Três cepas de tripanosomatídeos não puderam ser caracterizadas molecularmente porque não cresceram em meio LIT: a) uma isolada de *R. neglectus* proveniente de uma palmeira de Vargem Grande, Jaboticatubas; b) outra de *P. megistus* do intradomicílio de Guarazinho, Jaboticatubas; c) e a última de um *P. megistus* capturado no peridomicílio de Curral Queimado, Santana do Riacho. Deste *P. megistus* foi extraído o DNA a partir de um

fragmento do abdômen, entretanto, a amostra não foi amplificada por PCR *multiplex* para *T.cruzi*.

## **5 *Discussão***

---

Atualmente, a transmissão vetorial da DC no Brasil é considerada controlada graças às ações do PCDCH. Suas atividades iniciaram-se no ano de 1950, expandindo-se como uma campanha nacional a partir de 1975, sob a coordenação da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) e, posteriormente, da Fundação Nacional de Saúde (Dias 2002). Em 1999, as ações de controle foram transferidas para os municípios (SUS/ Portaria n. 1.399 do Ministério da Saúde, de 15 de dezembro de 1999; Diário Oficial da União 1999; 16 dez), tendo muitos deles descontinuado as atividades do PCDCH.

O município de Jaboticatubas seguiu com as atividades de controle, realizando a pesquisa de infestação em mais de 20% das suas localidades, o que supera as antigas orientações preconizadas pelo PCDCH (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública 1980). Entretanto, observa-se que no ano de 2010 houve acentuada redução no número de localidades investigadas. Isto se deu pela priorização do Programa de Controle da Esquistossomose, doença endêmica da região cujo controle é de responsabilidade da mesma equipe do PCDCH. A falta de prioridade do PCDCH historicamente vem ocorrendo desde 1986, quando grande parte do pessoal de campo foi transferida para o programa de controle da dengue, mas tem sido especialmente negligenciada a partir da descentralização do setor de saúde (Dias 2001).

A Secretaria de Saúde do Município de Santana do Riacho somente atende à demanda dos PITs. A desativação do PCDCH tem sido observada após a descentralização dos programas no Brasil, que não ocorrendo de forma gradativa, resultou na falta de preparo no repasse das responsabilidades para o município (Cerqueira *et al.* 2003). Maiores informações estão disponíveis em um estudo realizado na região centro-oeste de Minas Gerais, onde foram selecionados 54 municípios, dos quais 17 não responderam ao convite de participação e informação de dados. Muitos destes municípios tinham o programa de controle completamente desativado, o responsável inexperiente, ou os registros dos dados junto à Gerência Regional de Saúde não era realizado (Villela *et al.* 2005). No caso de Santana do Riacho, provavelmente a desestruturação do PCDCH ocorreu devido a outras prioridades do município. As atividades não foram retomadas após o treinamento dos agentes de saúde por ocasião da implantação deste estudo, e nem mesmo após terem tomado conhecimento da existência de notificações de focos de triatomíneos realizadas pelos moradores diretamente

à Gerência Regional de Saúde. Além disso, o município não procede a busca ativa, preconizada pelo Programa de Controle, ficando restrita a atividade ao atendimento às notificações realizadas pela população. Mesmo assim este trabalho é muito limitado, sem estímulo adequado para que haja a participação da comunidade.

Tem se observado que o sucesso da eliminação de populações domésticas de triatomíneos após a borrifação de inseticidas depende da espécie e da ocorrência de focos silvestres (Ceballos *et al.* 2011). Em Jaboticatubas apenas três localidades (Bom Jardim, Espada, Lapinha) foram positivas nos três ciclos de captura realizados, todas por *P. megistus*, demonstrando que o controle vetorial do município de Jaboticatubas é eficaz. Em contrapartida, a maioria (seis) das dez localidades infestadas em Santana do Riacho apresentou mais de uma habitação infestada, no mesmo ano ou não. Esse fato associado ao reduzido número de localidades com notificação nesse município pode ser devido à falta da busca ativa por triatomíneos nas UD's. Na falta desta metodologia, o PCDCH Santana do Riacho deveria fortalecer o sistema de notificações através dos PITs com ações educativas dirigidas à população.

Um desafio enfrentado pelos programas de controle de vetores é a determinação da fonte de reinfestação, se devido a indivíduos sobreviventes da borrifação; imigrantes de um foco doméstico não tratado ou silvestre; ou imigrantes trazidos por transporte passivo de outras comunidades (Ceballos *et al.* 2011). De qualquer forma, a borrifação sistematizada é essencial para o controle dessas populações de triatomíneos. Manne *et al.* (2012) verificaram que a borrifação em períodos superiores a seis meses aumenta 1,54 vezes a chance de reinfestação da comunidade por *R. prolixus*, e de 2,66 em períodos superiores a um ano. A detecção da reinfestação por *P. megistus* em Jaboticatubas ocorreu cinco meses após a borrifação e só foram encontradas ninfas. Provavelmente esse fato ocorreu pela eclosão de ovos remanescentes, já que o inseticida não penetra na casca dos ovos e/ou estes podem estar fora do alcance do inseticida, evitando o contato da ninfa após a eclosão. Vale ainda considerar que o *P. megistus* possui um ciclo anual (Dias & Dias 1968). Além disso, essa hipótese é reforçada pela análise de RADP, onde indivíduos oriundos das duas capturas encontram-se próximos no fenograma. Os eventos de reinfestação por *P. megistus* em Santana do Riacho só poderiam ser entendidos com estudos moleculares, já que ocorreram



em anos subsequentes e com presença de formas adultas e imaturas.

Em Laranjeiras II, Jaboticatubas, houve reinfestação de uma mesma unidade domiciliar, nas duas ocasiões por *T. sordida* em um galinheiro. Esta região possui vegetação bastante típica do cerrado, onde foram observados muitos troncos secos, abrigo silvestre característico de *T. sordida* (Diotaiuti *et al.* 1993). Na realidade não se sabe se a persistência da infestação neste galinheiro foi devido a uma nova invasão por triatomíneos silvestres ou por indivíduos que sobreviveram à borrifação, que é bastante comprometida no peridomicílio devido à complexidade das estruturas peridomiciliares (Diotaiuti *et al.* 1998) e pela menor vida útil do inseticida nestes ambientes (Szumlewicz 1975).

*P. megistus* foi a espécie de triatomíneo mais capturada em ambos os municípios. A importância vetorial desta espécie está bem determinada, pela sua suscetibilidade à infecção em condições experimentais (Szumlewicz 1988), e pela sua importância na transmissão humana do *T. cruzi* em amplas áreas. Bom exemplo é a descoberta da doença de Chagas, que se deu em área onde o vetor era, sem dúvida, o *P. megistus* (Chagas 1909). Muitas regiões mineiras apresentam histórico epidemiológico semelhante. Em Bambuí, MG, na década de 30, também foi esta a espécie de triatomíneo responsável pelos casos descobertos por Amílcar Vianna Martins (Dias 1982). Na região aqui estudada, como nos municípios vizinhos, as taxas de prevalência reveladas pelo inquérito nacional da doença de Chagas no Brasil variaram entre 6,5 e 25,2 (Brasil, Ministério da Saúde/SUCAM 1980), e seguramente foram devidas à colonização por *P. megistus*, uma vez que nos mesmos nunca houve colonização das casas por outras espécies, como o *T. infestans* (fonte: Cárdez, arquivos históricos do PCDCH organizados pela FUNASA; Diotaiuti 2009). Estudos recentes realizados na região centro-oeste de Minas Gerais relatam esse triatomíneo como o mais frequente, e alertam para a importância da manutenção da vigilância epidemiológica nos municípios com a presença dessa espécie, que apresenta alta antropofilia e capacidade de colonização das habitações humanas (Villela *et al.* 2005, 2009).

Outra espécie de triatomíneo capturada em Jaboticatubas foi *T. sordida*, encontrado exclusivamente em galinheiros e sem infecção por tripanosomatídeos. Esses achados confirmam a ocorrência da espécie na região, em geral com baixo poder de colonização do

intradomicílio e a predominância do hábito ornitofílico do *T. sordida*. No município de Santana do Riacho foram capturados insetos adultos dessa espécie em duas ocasiões no quarto, corroborando com a indicação de outros autores de que o *T. sordida* merece atenção da vigilância entomológica visto que pode eventualmente colonizar o intradomicílio (Dias 2001; de Oliveira & Silva 2007), e transmitir o *T. cruzi* para os moradores (Diotaitui 2009).

*P. diasi* e *T. vitticeps* foram as outras duas espécies capturadas em Santana do Riacho. *P. diasi* é uma espécie típica do cerrado (de Oliveira & Silva 2007; Carcavallo *et al.* 2009) e já foi descrita nos estados do centro-oeste brasileiro, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Maranhão (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012). Embora frequentemente coletada no ambiente artificial, nada se sabe sobre sua biologia, ecologia e genética (Patterson *et al.* 2009). Apesar de ter sido capturada no intradomicílio, não coloniza este ambiente correspondendo a invasões de adultos. Além disso, o *P. diasi* representa uma pequena porcentagem dos insetos capturados nesse (1,2%) e em outros estudos: em Uberlândia representou 0,8% das capturas no período de 2004 a 2008 (Paula *et al.* 2010); e no Distrito Federal 1,0% (Maeda *et al.* 2012).

O exemplar adulto de *T. vitticeps* capturado na sala de uma casa na localidade de Rio das Pedras em Santana do Riacho provavelmente foi atraído pela luz. Esse comportamento já é conhecido para o *T. vitticeps*, que invade as casas, mas raramente coloniza o intradomicílio (Diotaitui 2009). É uma espécie bastante associada à Mata Atlântica podendo ocorrer também no cerrado (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012). Formas adultas têm sido capturadas em áreas rurais dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo (Ferreira *et al.* 1986; Dos Santos *et al.* 2006; de Souza *et al.* 2010) e Bahia (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012). O *T. vitticeps* apresenta altas taxas de infecção natural e é encontrado colonizando o peridomicílio, fatores que aumentam o risco de transmissão do *T. cruzi* ao homem (Diotaitui 2009; de Souza *et al.* 2010). Recentemente houve um caso de transmissão para uma criança em Guarapari, Espírito Santo, muito provavelmente associado ao *T. vitticeps* (<http://g1.globo.com/espírito-santo/noticia/2012/04/primeiro-obito-causado-por-doenca-de-chagas-e-confirmado-no-es.html>).

O índice de infecção do *P. megistus* em Jaboticatubas foi semelhante ao observado na

região centro-oeste de Minas Gerais no período de 2000 a 2003 (1,3%) (Villela *et al.* 2005). Entretanto, foi menor em relação aos obtidos para a mesma região entre 2003 e 2007, quando os autores descrevem a infecção de 8,3% dos *P. megistus* examinados (Villela *et al.* 2009). Outros estudos mais antigos descrevem índices de infecção ainda maiores em diferentes municípios da região sudeste do Brasil (Barretto & Carvalheiro 1966, Ferraz Filho & Rodrigues 1987, Fernandes *et al.* 1992). É fato que a taxa de infecção de triatomíneos pode variar de acordo com o tempo ou local de estudo, como o observado pela Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN). Eles descrevem taxas de infecção para *P. megistus* variando de 0,2 no ano de 1969 a 25,9 em 1980, em uma análise de todo o período do PCDC em São Paulo (1968 – 2007) (Silva *et al.* 2011).

Para Dias e Coura (1997), a baixa taxa de infecção de triatomíneos domiciliados pode significar esvaziamento do ciclo doméstico do parasito, com redução de mamíferos infectados, e em consequência de atividades de controle. Fernandes *et al.* (1992) explicam a baixa infecção de *P. megistus* observada no município de Bambuí, Minas Gerais, na década de 90 pela alta proporção de sangue de aves identificada no conteúdo digestivo de *P. megistus*, o que de fato ocorreu pela eliminação das colônias intradomiciliares do vetor. Este fato explica o reduzido índice de infecção observado para Jaboticatubas em relação à Santana do Riacho (5,4), se considerado que 70,6 e 36,4 % das capturas foram realizadas em galinheiros, respectivamente.

A grande associação de *P. megistus* com galinheiros está de acordo com os dados de Villela *et al.* (2005, 2009) e Paula *et al.* (2010) para o estado de Minas Gerais. Pela complexidade de seus esconderijos e disponibilidade de fontes alimentares, triatomíneos silvestres são atraídos para o peridomicílio, ambiente este muito importante para a manutenção da infestação da UD, podendo ser fonte de infestação para o intradomicílio (Villela *et al.* 2005, 2010). Daí a importância do controle de focos peridomiciliares, dificultado pela degradação rápida dos inseticidas neste ambiente (Oliveira Filho 1989).

O *P. megistus* mais uma vez demonstra sua significância como vetor domiciliar pelo seu encontro preferencialmente nos quartos. Fato importante é o encontro de formas imaturas no intradomicílio de habitações em boas condições. Além de evidenciar o processo

de domiciliação na região, salienta a pressão de colonização do *P. megistus* mesmo em ecótopos artificiais organizados. Dessa forma, observa-se que não são suficientes as melhorias habitacionais para o controle da reinfestação por esta espécie (Villela *et al.* 2009), mas pode ser importante para limitar a densidade dos insetos nas casas.

As características da infestação por triatomíneos aqui descritas, apontam o *P. megistus* como a principal espécie vetora da DC em Jaboticatubas. Considerando o potencial vetorial desta espécie (Szumlewicz 1975) e sua capacidade de colonizar as casas, traz risco de transmissão os moradores de Jaboticatubas. Recomenda-se ao município prosseguir com as ações de controle com atenção especial às áreas de maior concentração de localidades infestadas indicadas pelo método de Kernel.

O estudo da ecologia e comportamento de triatomíneos silvestres é essencial para a condução dos programas de controle (Schofield *et al.* 1999), visto que é crescente o relato da invasão dessas espécies ao ambiente doméstico (Noireau *et al.* 2000). Entretanto, a busca manual por vetores silvestre é extremamente trabalhosa, por este motivo, algumas armadilhas são utilizadas para auxiliar essa pesquisa (Rabinovich *et al.* 1976; Carcavallo 1985, Noireau *et al.* 2000).

As armadilhas de Noireau são consideradas úteis para detectar a presença de triatomíneos em habitats silvestres terrestres ou arborícolas (Noireau *et al.* 2002). Utilizando-se essa metodologia foi possível capturar *R. neglectus* em 50% das palmeiras pesquisadas no Engenho, sendo esta, a única área que apresentou armadilhas de Noireau positivas entre as pesquisadas. O fato de duas (35%) palmeiras das oito dissecadas também estarem infestadas por *R. neglectus* demonstra que é uma região que apresenta forte colonização desse vetor nas macaubeiras. Ecótopo este característico para espécies do gênero *Rhodnius* (Lent, Wygodzinsky 1979.). Estudos demonstram a eficácia da armadilha de Noireau em palmeiras variando entre 2,3 a 43,3%, sendo que em uma área de caatinga brasileira foi 10,2% e na região amazônica, 19,4%. Outros ecótopos testados e suas respectivas eficácias foram: ocos de árvore (17,9 a 21,9 %); fendas em pedras (27,6%); e fendas em barrancos (21,6%). Este estudo relata ainda a captura de *T. sordida* em 37,7% das árvores pesquisadas no Chaco Boliviano, e de *P. megistus* em 21,4% das árvores pesquisadas no leste andino da Bolívia

(Noireau *et al.* 2002). O primeiro foco silvestre de *P. megistus* descrito no município de Bambuí, Minas Gerais, foi descoberto em um grande oco de árvore com a utilização dessas armadilhas, vale ressaltar que após muito esforço de captura (Santos Júnior *et al.* 2011). Já no norte de Minas Gerais foram investigados três fragmentos de mata em região de ocorrência de *T. sordida* sem sucesso de captura (Vianna 2011). Nesse contexto, e com a experiência de campo do grupo de pesquisa (dados não publicados), é considerado que a eficiência da armadilha esteja relacionada com uma grande densidade populacional dos triatomíneos.

As armadilhas luminosas podem ser eficientes em locais com vegetação aberta e com grande número de insetos adultos, que podem ser atraídos pela luz (Rabinovich *et al.* 1976; Carcavallo *et al.* 1985). Frente a grande dificuldade enfrentada nesse estudo para a captura de insetos silvestres, a baixa densidade de formas adultas de triatomíneos na região da Serra do Cipó poderia explicar a ineficiência dessa armadilha aqui apresentada.

As palmeiras representam um habitat favorável para os vetores da DC uma vez que provê refúgio para fontes de alimentação tais como aves, marsupiais, roedores, morcegos, anfíbios e répteis, além de um microclima estável. Por esses motivos, elas têm sido reconhecidas como habitat de diversas espécies de triatomíneos (Barretto *et al.* 1969, Forattini *et al.* 1971, Gamboa 1973, Feliciangeli & Torrealba 1977, Whitlaw & Chaniotis 1978, D' Alessandro *et al.* 1984, Rossell-Reyes 1984, Diotaiuti *et al.* 1993). *R. neglectus*, *T. sordida* e *P. megistus* foram capturados em macaubeiras dissecadas na região da Serra do Cipó, sendo a primeira a mais frequente. A palmeira de macaúba já é conhecidamente hábitat do *R. neglectus*, como descrito por Diotaiuti & Dias (1984) na periferia da cidade de Belo Horizonte, onde foram capturados 463 *R. neglectus* em 49 macaubeiras dissecadas, com densidade de 9,45 e taxa de infecção de 15,9, ambos os índices maiores do que o observado no presente estudo (2,1 e 8,22, respectivamente).

O encontro de *T. sordida* em palmeiras também já foi demonstrado no estado de Minas Gerais, no município de Uberaba, onde foram verificadas infestações variando de 17,6 a 50%, com densidade populacional de 2,1 e 8,3 triatomíneos (Barretto *et al.* 1969). Essa associação também foi observada no nordeste da Argentina por Bar & Wisnivesky-Colli

(2001). Na palmeira onde foi encontrado *T. sordida* também foi capturado *R. neglectus*, a coabitação de espécies de triatomíneos é frequente. Tonn *et al.* (1976) verificaram que 75,1% das *Acrocomia* sp. estavam infestadas por cinco espécies de triatomíneos. Feliciangeli & Torrealba (1977) descrevem o encontro de *R. prolixus* com *T. maculata*; Whitlaw & Chanotis (1978) de *R. pallescens* com *T. dimidiata*; e Diotaiuti & Dias 1984 de *P. megistus* com *R. neglectus*, mas sempre com a predominância de uma espécie.

A captura de *P. megistus* em palmeiras é considerada excepcional (Barretto *et al.* 1964). Essa espécie já foi capturada em quatro palmeiras na periferia de Belo Horizonte, que, como descrito anteriormente, também estavam infestadas por *R. neglectus*. Dos nove *P. megistus* examinados, dois estavam infectados (22,2%). Vale ressaltar que a colônia encontrada em Jaboticatubas apresentava densidade populacional maior se comparada com as outras espécies observadas.

As palmeiras podem representar foco de dispersão de triatomíneos para as habitações humanas e seu ambiente peridomiciliar. Esse fato toma maior importância se considerado o encontro de *P. megistus* e *T. sordida* infectados por *T. cruzi*, espécies que colonizam o ambiente artificial da região da Serra do Cipó. Deve ainda ser considerado que o encontro de cada uma das espécies em apenas uma macaúba, provavelmente não reflita o cenário real de infestação se observada a limitação da amostra estudada e as dificuldades na dissecação de palmeiras. Dentre as limitações estão o tamanho pequeno, a cor, agilidade e fotofobia dos triatomíneos, a arquitetura da palmeira e presença de numerosos espinhos (Diotaiuti & Dias 1984). Embora *R. neglectus* tenha sido a espécie mais frequentemente encontrada no ambiente silvestre, sua importância epidemiológica é pequena, uma vez que raramente invade o ambiente domiciliar (Pedreira de Freitas *et al.* 1961, Diotaiuti & Dias 1984). Durante o presente estudo, nenhum exemplar de *R. neglectus* foi capturado em UD's, sendo assim, seu papel na manutenção do *T. cruzi* na região da Serra do Cipó se restringe ao ciclo silvestre da DC. Entretanto, é importante considerar que a importância dessa espécie varia nas diferentes regiões do Brasil, tendo sido recentemente responsável por casos humanos no estado do Tocantins (Diotaiuti *et al.* 2010).

Um dos desafios para o controle da DC consiste no fato de que o ciclo de transmissão

silvestre do parasita ocorre numa rede trófica complexa que inclui vários mamíferos (Briones *et al.* 1999). Dessa forma, alguns reservatórios sinantrópicos de *T. cruzi* têm um importante papel no intercâmbio dos ciclos silvestre e doméstico do parasito (Fernandes *et al.* 1989). A captura de pequenos mamíferos foi bastante heterogênea, tanto no número de animais capturados quanto se roedor ou marsupial, nos dois municípios estudados. Um dos aspectos observados foi a grande captura de roedores nas áreas de lapa (Lapinha da Serra e Lapinha), associação essa já descrita (Herrera *et al.* 2004). Os locais com baixa captura podem ser explicados devido à ausência de cursos de água próximo, às baixas temperaturas no período da coleta ou mesmo pela pequena densidade de reservatórios.

O ciclo silvestre de tripanosomatídeos no cerrado permanece pouco investigada (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004). A infecção por *T. cruzi* em marsupiais na região estudada foi considerável, 16,3% dos capturados, menor em relação a diversos estudos, entretanto, maior que o observado por Gurgel-Gonçalves *et al.* (2004) em área de cerrado (4,8%). Se considerarmos que estes reservatórios se concentraram em apenas quatro das 15 localidades investigadas, teremos índices de infecção bastante altos. Este evento somado à presença de triatomíneos domiciliares, como confirmado em Terra Vermelha e Juá II (Jaboticatubas), caracterizam essas áreas como de risco de transmissão da DC. Esses dados coincidem com os *clusters* identificados pelo método de Kernel, visto que Terra Vermelha encontra-se em uma região de alta concentração de localidades infestadas, e Juá II em área classificada como de média-alta. Esses fatos reforçam a necessidade de maior atenção pelo PCDC nas regiões de maior aglomeração de localidades infestadas por *P. megistus*.

Outros estudos ressaltam a importância epidemiológica de mamíferos do gênero *Didelphis* devido principalmente aos seus altos índices de infecção: em Belém 91,7% (Rodrigues & Melo 1942); Rio de Janeiro 35,7% (Guimarães & Jansen 1943); Ceará 26,6% (Alencar *et al.* 1962); Santa Catarina 23,5% (Júnior *et al.* 1962); Bambuí 31,5% e 36,7% (Fernandes *et al.* 1987, 1989). Além desses fatos, os gambás apresentam parasitemia patente com longa duração (Alvarez Crespo 1947; Barretto 1964; Zeledón *et al.* 1970) e servem de fonte de alimentação para triatomíneos (Barretto 1964). Somado a todos esses fatores, podem transmitir o *T. cruzi* por outras vias que não as habituais, por exemplo, a via oral pela contaminação de alimentos (Silva *et al.* 1968; Shaw *et al.* 1969; Marcondes *et al.* 1988).

A importância dos cães como reservatórios e sua participação no ciclo doméstico da DC já são bem definidos, podendo ser considerados “sentinelas” para os PCDC em regiões onde a forma vetorial é a única via de transmissão (Gürtler *et al.* 1998). Em Santiago Del Estero, Argentina, a infecção de cães foi acompanhada em paralelo ao programa de controle implantado na região. A soropositividade para infecção por *T. cruzi* foi notavelmente decrescente para intervalos de dois anos: em 1992 foi de 65%; em 1994, 39%; e 15% em 1996. Além disso, estudos apontam que a presença de cães infectados no domicílio pode quadruplicar o risco de infecção humana pelo *T. cruzi* (Basombrio *et al.* 1993), e que os triatomíneos adquirem a infecção mais facilmente em cães em relação a humanos (Gürtler *et al.* 1996).

Os cães geralmente apresentam altas taxas de infecção por *T. cruzi*, entretanto, seu papel na transmissão da DC varia de acordo com o local de estudo (Noireau *et al.* 2009). Em Jaboticatubas a prevalência foi de 2,4%, bastante inferior a estudos já realizados no estado de Mato Grosso do Sul (22,7%) (Souza *et al.* 2009); São Paulo (40%) (Troncarelli *et al.* 2009), no nordeste brasileiro (21,9%) (Lima *et al.* 2012), em comunidades rurais do Panamá (16,2%) (Pineda *et al.* 2011) e nordeste da Argentina (60%) (Gürtler *et al.* 2007). Ainda assim os cães possuem um papel importante na dispersão do *T. cruzi* no município de Jaboticatubas devido a sua proximidade com o homem.

Alguns autores associam *T. cruzi* I ao ciclo silvestre e *T. cruzi* II ao ciclo doméstico da DC (Anonymous 1999), outros consideram o primeiro grupo como encontrado predominantemente na região amazônica e *T. cruzi* II, ao sul (Gaunt *et al.* 2000, 2003; Yeo *et al.* 2005). Na região da Serra do Cipó o tipo predominante observado foi *T. cruzi* I, considerando aqui sua associação com o ciclo silvestre. A cepa foi identificada como *T. cruzi* II, isolada de um *P. megistus* intradomiciliar, demonstra a ocorrência de formas associadas ao ciclo doméstico da DC. Estudos de fonte alimentar são necessários para investigar a associação dessas cepas ao tipo de reservatório.

A entomologia médica busca reconhecer a forma como cada vetor se organiza ao nível populacional, se em subpopulações separadas ou se há fluxo entre os diferentes ambientes onde o vetor ocorre. Esse conhecimento pode auxiliar na implantação das



estratégias de controle. A morfometria geométrica avalia a estrutura populacional através da estimação do tamanho, da forma e da relação entre estas duas variáveis (alometria). O tamanho e a forma referem-se à medição de parte do organismo em estudo, sendo a escolha preferencial a asa, que, por ser uma estrutura de duas dimensões, reduz o erro de digitalização (Dujardin 2008).

O dimorfismo sexual observado em todos os grupos deste estudo já é conhecido para diversas espécies de triatomíneos, sendo geralmente as fêmeas maiores que os machos (Lent & Wygodzinsky 1979). A presença dessa característica pode indicar que os indivíduos não estão sujeitos a fatores de estresse existentes principalmente no intradomicílio, já que estes podem resultar em repastos incompletos e/ou ecdises sucessivas, que levam à diminuição do tamanho dos insetos e ao desaparecimento do dimorfismo sexual (Dujardin *et al.* 1999). Dessa forma, a existência do dimorfismo sexual em uma população doméstica sugere que o evento de invasão seja recente (Vargas *et al.* 2006).

O tamanho centroide não foi diferente para nenhum grupo amostrado, o que era esperado, já que tem sido demonstrado que a variação de tamanho entre subpopulações coespecíficas se dá pela distância geográfica ou diferenças eco geográficas (Dujardin 2008), o que não ocorre na área estudada. A diferenciação de tamanho também pode ocorrer devido a fatores como densidade populacional e alimentação, que poderiam explicar a modificação de tamanho de triatomíneos do ambiente natural para habitats domésticos (Zeledón *et al.* 1970; Zeledón 1980; Dujardin *et al.* 1997, 1999; Jaramillo *et al.* 2002; Rodríguez *et al.* 2007; Feliciangeli *et al.* 2007). Sendo assim, as amostras aqui estudadas estariam passando por um processo de domiciliação recente.

As mudanças ambientais afetam primariamente o tamanho do inseto, que pode alterar passivamente a conformação (efeito alométrico). Esta hipótese deve ser verificada e é recomendado o uso de variáveis livres de alometria, entretanto, em estudo coespecíficos, a utilização ou não destas variáveis, não deve gerar diferenças na análise (Dujardin 2008). Justamente esse cenário foi observado quando realizada a regressão multivariada entre as variáveis de conformação e o tamanho centroide, demonstrando a existência de alometria, e posterior regressão entre as variáveis sob-hipótese de resíduo alométrico diferente ou igual

entre os grupos, revelando que a alometria seria a mesma em toda a amostra. Dessa forma, podemos considerar que os fatores genéticos são os responsáveis pelos resultados obtidos nas análises de conformação, que revelaram a existência de duas populações na amostra estudada: 1) indivíduos do ambiente silvestre e 2) indivíduos do ambiente artificial. Esses achados sugerem que os *P. megistus* da região da Serra do Cipó veem sofrendo adaptações para o ambiente artificial.

A adaptação de vetores ao ambiente domiciliar é frequentemente um mecanismo de constituição de subpopulações com maior importância epidemiológica (Campbell-Lendrum *et al.* 2001; Dujardin 2008). Dujardin *et al.* (1998) descreveram sucessivos passos na adaptação de *T. infestans* ao ambiente doméstico e sugerem que estes possam ser estendidos a outros vetores: 1) somente uma parte dos genótipos silvestres possuem a capacidade de constituir colônias domiciliares com sucesso; 2) a dispersão do inseto pode se dar devido à sua dependência em relação ao hospedeiro, podendo ocorrer sua dispersão passiva por humanos, por exemplo, por uma distância geográfica grande, fora de sua área de ocorrência original; 3) mudanças nas propriedades genéticas como consequência do isolamento do foco silvestre original e do efeito fundador nas novas áreas de colonização; 4) conforme aumenta sua expansão geográfica, a domiciliação torna-se um hábito mais exclusivo, e algumas populações com altos níveis de endocruzamento podem mostrar evidências externas de instabilidade, tais como aumento de assimetria ou anomalias morfológicas unilaterais. Considerando a ampla distribuição geográfica do *P. megistus* (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012), e que as colônias domiciliares constituíram um só grupo, podemos supor que a diferenciação de conformação observada nas amostras domiciliadas em relação à silvestre, ocorra devido à capacidade diferencial que alguns indivíduos de *P. megistus* possuem para colonizar o ambiente artificial.

Estudos moleculares que vão do nível de intratribos ao intraespecífico, têm auxiliado no entendimento da sistemática, biogeografia, comportamento, taxonomia e evolução da subfamília Triatominae, e seus resultados utilizados para o melhoramento das estratégias de controle de vetores de vários países da América Latina. O sequenciamento do DNA provê a informação mais direta para inferências filogenéticas e avaliações de parentesco entre organismos e populações (Abad-Franch & Monteiro 2005). Fragmentos de DNA genômico

são geralmente mais conservados que genes mitocondriais, sendo assim, são mais adequados para estudos interespecíficos. Entretanto, espaçadores do DNA ribossomal, tais como ITS, podem ser informativos para análises populacionais (Hillis *et al.* 1996). Marcilla *et al.* (2001) consideraram a região ITS-2 um marcador adequado para resolver questões ao nível populacional em espécies de triatomíneos, uma vez que detectaram variações nucleotídicas pontuais interpopulacionais e, principalmente, a presença de diferenças no número de repetições de microssatélites. Entretanto, a região ITS-2 não se apresentou como um marcador capaz de detectar variabilidade genética entre os *P. megistus* provenientes da região da Serra do Cipó. Alguns estudos populacionais com triatomíneos utilizando ITS-2 como marcador também observaram homogeneidade populacional, sendo somente possível diferenciar populações geográficas (Marcilla *et al.* 2000; Pacheco *et al.* 2003, 2007; Blandón-Naranjo *et al.* 2010).

A RAPD é uma metodologia que não requer o sequenciamento do DNA, possui baixo custo, é eficiente no desenvolvimento de um grande número de marcadores de DNA em um tempo curto e requer equipamentos simples. A principal crítica no uso dessa técnica seria sua reprodutibilidade (Bardakci 2001). Neste trabalho foram utilizados os mesmos equipamentos, reagentes e manipulador para evitar essa falha. Outra desvantagem está no fato de ser um marcador dominante, dessa forma, a estimativa de frequência gênica é menos precisa em relação ao uso de marcadores co-dominantes, sendo sugerido o uso de 2 a 10 vezes mais indivíduos para a obtenção do mesmo grau de poder estatístico (Lynch & Milligan 1994). A consideração de que bandas de mesmo tamanho são homólogas também apresenta problemas, embora não tão críticos quando os indivíduos pertencem à mesma população (Bardakci 2001). Considerando os problemas citados e na ausência de um marcador mais sensível para detectar diferenças populacionais de *P. megistus*, a RAPD foi selecionada para o estudo populacional, pois, por outro lado, a RAPD é capaz de revelar o fluxo de triatomíneos entre o ambiente silvestre e domiciliar (Garcial *et al.* 1998; Borges *et al.* 2000). Os quatro iniciadores testados apresentaram-se reprodutíveis e capazes de detectar variabilidade genética mesmo quando estudados *P. megistus* de uma região geográfica mais restrita. Barbosa *et al.* (2006) já haviam validado os mesmos iniciadores em um estudo considerando a distribuição brasileira de *P. megistus*.

A grande variabilidade genética observada (0,28 a 0,72) surpreende se comparados os resultados deste com um estudo anterior (Barbosa *et al.* 2006) realizado com populações de *P. megistus* provenientes de sete estados brasileiros de diferentes ecótopos, domínios e regiões geográficas, onde a análise indicou coeficiente de similaridade de Dice variando de 0,60 a 0,92. Essa maior variabilidade pode ser explicada pelos fatos de o estudo aqui relatado ter sido realizado com insetos coletados em campo, ou seja, geração parental, e devido ao uso de somente um indivíduo por ponto de coleta (exceto pela amostra representativa do ambiente silvestre). Barbosa *et al.* (2006) trabalharam com insetos da primeira geração em laboratório e com cinco representantes de cada grupo.

Não foi observada estrutura populacional entre *P. megistus* provenientes do ambiente silvestre, peridomicílio e intradomicílio, provavelmente em consequência da dispersão de triatomíneos dos ecótopos naturais para o ambiente artificial (Carvalho-Costa *et al.* 2010). Além disso, como demonstrado anteriormente, o PCDCCH no município de Jaboticatubas realiza buscas anuais e borrifação nas UDs infestadas por triatomíneos, evitando a ocorrência de colônias antigas que, por consequência de endocruzamentos, poderiam ser diferenciadas geneticamente. Deve ser considerado também que a distância geográfica entre as populações é um fator importante para determinação de sua estrutura genética (Dujardin *et al.* 1998; Barbosa *et al.* 2006; Barges *et al.* 2006, Pacheco *et al.* 2007). O *cluster* dos *P. megistus* capturados no intradomicílio pode significar que os indivíduos que colonizam este ambiente possuem uma capacidade diferencial para este fim, assim como o sugerido para a análise morfométrica em relação à domiciliação dos *P. megistus*, resgatando a antiga proposta de Pessoa (1962) de que a capacidade de colonização tenha origem genética.

Em contraste com a morfometria geométrica, o dendograma com a análise de RAPDs não evidenciou diferenças na amostra do ambiente silvestre, sendo possível que o agrupamento observado na análise morfométrica seja devido à plasticidade fenotípica, ou seja, à expressão de diferentes fenótipos em um mesmo genótipo quando sujeitos a diferentes condições ambientais (Whitman 2005). Vargas *et al.* (2006) também observaram essa discordância entre os diferentes métodos, entretanto, se comparadas amostras do peridomicílio e intradomicílio.

Embora não tenha sido observada estruturação populacional nos *P. megistus* de Jaboticatubas, algumas considerações acerca de reinfestações puderam ser tomadas, demonstrando ser a RAPD capaz de auxiliar o entendimento dos eventos de infestação por esse triatomíneo. Essas observações evidenciam que o *P. megistus* pode infestar as habitações através de diversas formas, seja a partir de um foco domiciliar, como o observado nas localidades Espada e Guarazinho, ou a partir de diferentes focos, possivelmente silvestres, nas localidades Felipe e em São José da Serra.

O desafio principal do PCDCH no Brasil foi a eliminação do *T. infestans* (Silveira & Vinhaes 1998), espécie alóctone, foi introduzida no país por transporte passivo, provavelmente a partir da Argentina e Uruguai (Monteiro *et al.* 1999). Vetor competente, ele foi o principal responsável pela transmissão humana do *T. cruzi* no Brasil. Em 2006, o Brasil foi certificado quanto à interrupção da transmissão vetorial pelo *T. infestans* (Dias 2006). Lamentavelmente este grande feito foi confundido com a “eliminação da transmissão do *T. cruzi*”, com graves consequências para o PCDCH, negligenciado no país principalmente devido aos baixos níveis de transmissão da enfermidade, à emergência de outras doenças e a questões político-administrativas (Paula *et al.* 2010). Felizmente este não foi o caso de Jaboticatubas, que manteve o controle dos triatomíneos. As características da infestação pelo *P. megistus* descritas aqui alertam uma vez mais para o potencial deste vetor, que se não controlado, pode colonizar as casas e trazer risco de transmissão para os moradores.

Vale considerar o contexto atual do município de Jaboticatubas. Além dos temas já abordados, o município apresenta uma particularidade, que é a sua beleza natural, sofrendo por isso enorme especulação imobiliária devido ao interesse turístico. Vários condomínios de casas têm sido implementados, gerando grande impacto ambiental. Além do processo de urbanização, é possível observar a ação antrópica na modificação da cobertura vegetal do município, com presença de extensas áreas de pastagens e culturas por quase todo o município, excetuando as áreas protegidas a leste e as matas de galeria, estas constituindo o principal refúgio do *P. megistus* e de onde os insetos podem dispersar-se colonizando ambientes artificiais (Forattini 1980). Dessa forma, esta região merece atenção especial quando se refere ao controle da DCH e outras antropozoonoses. Quanto ao modelo de controle, vale uma reflexão sobre as atividades desenvolvidas em Jaboticatubas. A

recomendação oficial propõe a busca ativa de triatomíneos em no mínimo, 20% das localidades do município, o que é seguido pelo serviço municipal. Entretanto, observando-se o número de UDs infestadas por ciclo (entre 16 e 35), a metodologia de vigilância implementada por Dias e Garcia (1975) em Bambuí poderá atender perfeitamente o objetivo de prevenção dos focos domiciliares. Este método propõe um amplo trabalho educativo e de divulgação que permitiu o encontro de barbeiros pelos próprios moradores, que notificando o encontro do inseto tinham as casas borrifadas. Este modelo foi posteriormente implantado em todas as áreas de vigilância de Minas Gerais (Moreno & Baracho. 2000) e também em outros estados brasileiros, sendo adotado também em outros países. A vantagem deste método é que introduz um forte componente de participação da população, convidada a mudar seus hábitos e a promover melhorias nas suas casas. A suspensão da busca ativa libera o agente de saúde para o desenvolvimento destas atividades educativas, restringindo-se o trabalho vertical a avaliações periódicas sobre a efetividade da vigilância. Mesmo tendo o trabalho em Santana do Riacho limitado a 10 localidades, onde foram positivas 22 UDs, a vigilância participativa poderia ser o método de controle de escolha também neste município, pois o número total de UDs infestadas não deverá ser tão grande a ponto de inviabilizar o atendimento às notificações. Desta maneira, tanto para Jaboticatubas quanto para Santana do Riacho, recomenda-se a implantação da vigilância participativa para o controle dos triatomíneos.

## **6 Conclusões**

---

A população dos dois municípios permanece sob o risco de infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que são encontrados vetores infectados no ambiente artificial e sobretudo no intradomicílio, preferencialmente nos quartos.

*P. megistus* e *T. sordida*, *P. diasi* e *T. vitticeps* são as espécies que invadem o ambiente artificial nos municípios de Santana do Riacho e Jaboticatubas, sendo *R. neglectus* exclusivamente silvestre.

*P. megistus* é a principal espécie vetora do *T. cruzi* em Jaboticatubas e Santana do Riacho.

A manutenção do programa de controle através da aplicação de inseticidas nos domicílios por si só não previne a reinfestação por triatomíneos silvestres, mas mantém baixa a densidade dos insetos.

A baixa taxa de infecção de vetores capturados nas UD's em Jaboticatubas pode ser devida a maior associação da espécie com galinheiros.

As habitações visitadas em ambos os municípios são de bom padrão, o que não é suficiente para evitar a infestação domiciliar por *P. megistus*, inclusive com colônias intradomiciliares, principalmente nos quartos.

A vigilância participativa é recomendada como método de controle dos triatomíneos em Jaboticatubas e Santana do Riacho.

Com a identificação de *T. cruzi* em vetores e reservatórios silvestres e domésticos conclui-se que o parasita circula entre os ambientes naturais e artificiais do município de Jaboticatubas e, possivelmente, em toda a região da Serra do Cipó, requerendo vigilância epidemiológica constante.

A palmeira de macaúba é habitat silvestre para *P. megistus*, *T. sordida* e *R. neglectus*, na região estudada.



A amostra de *P. megistus* capturada no ambiente silvestre foi diferenciada morfometricamente das oriundas do ambiente artificial, provavelmente devido à plasticidade fenotípica.

O dimorfismo sexual acentuado indica recente domiciliação dos *P. megistus* domésticos.

A caracterização da região intergênica ITS-2 não foi adequada para a determinação de populações diferentes de *P. megistus* na área estudada.

A RAPD apresentou-se mais sensível para a detecção de variabilidade intraespecífica, mostrando-se também adequada para auxiliar estudos de determinação de fontes de reinfestação por *P. megistus*.

Os exemplares de *P. megistus* capturados em Jaboticatubas não apresentaram estrutura populacional, sugerindo constante fluxo gênico entre os diversos ambientes.

Na região estudada, circulam os tipos I e II de *T. cruzi*, com predominância do grupo *T. cruzi* I, que pode ser encontrado no ambiente silvestre e doméstico, e o grupo II, no ambiente domiciliar.

## **7 Referências Bibliográficas**

---

- Abad-Franch F & Monteiro FA 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc*; 77(3): 437-454.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L 2009. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop*; 110(2-3):159-77.
- Acosta N, Samudio M, López E, Vargas F, Yaksic N, Brenière SF, Rojas de Arias A 2001. Isoenzyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from different areas of Paraguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96(4):527-33 .
- Alencar JE & Scherlock VA 1962. Triatomíneos capturados em domicílio no Estado do Ceará. Brasil. *Bol ceare Agro*, 3:49-54.
- Alvarez Crespo J 1947. Informaciones epidemiológicas de La enfermedad de Chagas en la localidad Guayaquil, 1942-1946. *Publ Univ Guayaquil, Cienc Med*, 22, 9pp.
- Anderson JM, Lai J, Dotson EM, Cordon-Rosales C, Ponce C, Norris DE, Beard CB 2002. Identification and characterization of microsatellite markers in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera Reduviidae), a Chagas disease vector. *Infect Genet Evol*. 1: 243-248.
- Anonymous 1999. Recommendations from a satellite meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94 (Suppl. 1):429–432.
- Apostol BL, Black WC, Reiter P, Miller BR 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*; 76 (4):325-34.
- Aragão MB 1961. Aspectos climáticos da doença de Chagas. II – Área de ocorrência do *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop*; 13: 171-193.
- Aragão MB 1981. Sobre a domiciliação de triatomíneos. *Rev Soc Bras Med Trop*; 14(1): 13-27.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*;48(2):211-21.
- Azeredo BVM 2003. Manual de Borrifação do PCDCh. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais.
- Bailey TC, Gatrell AC 1995. Interactive spatial data analysis. 1°. ed. Essex: LongmanGroup Limited; 413 p.
- Bar ME, Wisnivesky-Colli C 2001. *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96(7):895-9.
- Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RC, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L 2006. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. *Acta Trop*; 99(2-3):144-54.

- Barbosa SE, Dujardin JP, Soares RPP, Pires HHR, Margonari C, Romanha AJ, Panzera F, Linardi PM, Duque-de-Melo M, Pimenta PFP, Pereira MH, Diotaiuti L. 2003. Interpopulation Variability Among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. *J Med Entomol*; 40(4): 411-420.
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP, Mas-Coma S 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol*; 6(1):46-62.
- Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S 2002. Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*,96 (Suppl 1):159-64.
- Bargues MD, Marcilla A, Ramsay JM, Dujardin JP., Schofield CJ, Mas-Coma S. 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 95: 67-573.
- Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitol*;120:513-26.
- Barretto MP 1964. Reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the Americas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*; 4:527–552.
- Barretto MP 1979. Epidemiologia. In: Brener Z. & Andrade Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap. 3, p. 89-151.
- Barretto MP, Albuquerque RDR, Funayama GK 1969. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do "*Trypanosoma cruzi*". XXXVI: investigações sobre triatomíneos de palmeiras no município de Uberaba, MG, Brasil. *Rev Bras Biol*; 29: 577-588.
- Barretto MP, de Siqueira AF, Ferriolli Filho F, Carvalheiro JR 1968. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*: 23. Observações sobre criadouros do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em biótopos artificiais (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 10(3): 163–170.
- Barretto MP, Siqueira AF, Freitas JP 1964. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. II- Encontro de *Panstrongylus megistus* em ecótopos silvestres no estado de São Paulo (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 6: 56-63.
- Belisário CJ 2006. Caracterização morfológica e molecular de híbridos do cruzamento entre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). Instituto Oswaldo CRUZ (dissertação) 91pp.
- Bogliolo AR, Chiari E, Silva-Pereira RO, Silva-Pereira AA 1986. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South America. *Braz J Med Biol Res*;19(6):673-83.
- Bookstein, FL 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University Press.

- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. 2005. Dynamic between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) at the municipality of Independência, Northeastern Brazil. *Acta Tropica*; 93(1):119-26.
- Borges, EC; Romanha AJ; Diotaiuti L. 2000. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in the populational study of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Cadernos de Saúde Pública*; 16(2):97-100.
- Brasil, Ministério Saúde/SUCAM, Divisão de Doença de Chagas 1980. Inquérito Sorológico: Prevalência por Município. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde.
- Briones MRS, Souto RP, Stolf B, Zingales B 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*; 104:219–32.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, *et al* 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Inf Gen Evol*; 2: 173-83.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*; 31(11):1218-26.
- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. 1993. 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*; 88(1):171-2.
- Burmeister H. 1835. *Handbuch der Entomologie*. Berlin, vol.2, part 1, iv + 400 + 4 pp.
- Caldeira RL 1999. Identificação molecular e análise da variabilidade genética dos moluscos do complexo *Biomphalaria straminea* através das técnicas de PCR-RFLP e SSR-PCR. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. (Tese)
- Camara G, Souza RCM, Freitas UM, Garrido J 1996. SPRING: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modeling. *Computers & Graphics*; 20(3): 395-403.
- Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 6(3): 93-100.
- Carbajal de la Fuente AL, Porcasi X, Noireau F, Diotaiuti L, Gorla D 2008. The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae) with environmental variables recorded by remote sensors. *Infect Genet Evol*; 9:54-61.
- Carcavallo RU 1985. Técnicas de estudio de triatominos en ambiente silvestre. In RU Carcavallo, JE Rabinovich, RJ Tonn (eds), *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*, vol. 1, OPS-ECO/MSAS-SNCH, Buenos Aires, p. 49-52.

- Carcavallo RU, Curto-de-Casas SI, Sherlock I, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Galvão C, *et al.* 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. *In*: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of Chagas disease vectors in Americas. Vol. III. FIOCRUZ: Rio de Janeiro; p. 747-792.
- Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürtler RE 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann Trop Med Parasitol*; 92(6):671-83.
- Castro AM, Vinaud MC, Teixeira A 2009. Chagas Disease: A Global Health Problem. *In*: History of Chagas Disease as a Public Health Problem in Latin America. Editores: Antonio Teixeira, Marina Vinaud, Ana Maria Castro. Editora: Bentham Science.
- Ceballos LA, Piccinali RV, Marcet PL, Vazquez-Prokopec GM, Cardinal MV, Schachter-Broide J, Dujardin JP, Dotson EM, Kitron U, Gürtler RE 2011. Hidden sylvatic foci of the main vector of Chagas disease *Triatoma infestans*: threats to the vector elimination campaign? *PLoS Negl Trop Dis*; 5(10):e1365.
- Cecere MC, Vasquez-Prokopec GM, Gürtler RE, Kitron U 2006. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerg Infect Dis*; 12(7):1096-102.
- Cecere MC, Vasquez-Prokopec GM, Gürtler RE, Kitron U. 2004. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*; 71: 803-810.
- Cerqueira EM, Assis MMA, Villa TCS, Leite JA 2003. Vigilância epidemiológica no processo de municipalização da Saúde de Feira de Santana – BA. *Epidemiol Serv Saúde*; 12:213-23.
- Chagas C 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Clarke KC, Mclafferty SL, Tempalski BJ 1996. On epidemiology and geographic information systems: a review and discussion of future directions. *Emerg Infect Dis*; 2:85-92.
- Cohen JE & Gürtler RE 2001. Modeling household transmission of American Trypanosomiasis. *Science*; 293: 694-698.
- Cominetti MC, Andreotti R, Oshiro ET, Dorval ME 2011. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 44(5):576-81.
- Corrêa RR; Silva EOR & Schiavi A 1963. Observações sobre o *Panstrongylus megistus*, transmissor da moléstia de Chagas (Hemiptera, Reduviidae). *Arq Hig Saude Publ*; 28: 165-174.
- Coura JR, Ferreira LF & Silva JR 1966. Triatomíneos no Estado da Guanabara e suas relações com o domicílio humano. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 8: 162-166.
- Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O 1999. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94(Suppl 1):379–84.

- Cruz CD 1990. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Tese (Doutorado) - ESALQ. Piracicaba.
- D'Alessandro A, Barreto P, Saravia N, Barreto M 1984. Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the oriental plains of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*; 33:1084-1095.
- de Oliveira AW, da Silva IG 2007. Geographical distribution and indicators entomologic of sinantropic triatomines captured in the State of Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop*; 40(2):204-8.
- de Souza R de C, Diotaiuti L, Lorenzo MG, Gorla DE 2010. Analysis of the geographical distribution of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) based on data of species occurrence in Minas Gerais, Brazil. *Infect Genet Evol*; 10(6):720-6.
- de Souza RCM, Diotaiuti L, Lorenzo MG, Gorla DE 2010. Analysis of the geographical distribution of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) based on data of species occurrence in Minas Gerais, Brazil. *Infect Genet Evol*; 10(6): 720–726,.
- Dias E, Dias JCP 1968. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e do *Panstrongylus megistus* no município de Bambuí, Estado de Minas Gerais (IIª nota: 1951 a 1964). *Mem Inst Oswaldo Cruz*;66(2):209-26.
- Dias JC 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today*;3(11):336-41.
- Dias JC 2001. Chagas disease, environment, participation, and the state. *Cad Saude Publica*;17 (Suppl):165-9.
- Dias JCP & Diotaiuti L 1998. Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Guhl F, Jaramillo CA, eds.; Curso Taller. Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis. Santafé de Bogotá, Colombia: Corcas Editores Ltda.
- Dias JCP & Garcia ALR 1978. Vigilancia Epidemiologica con participación comunitária. Um programa de enfermidade de Chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*; 84:533-544.
- Dias JCP 1995. Natural history of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*; 65: 359–66.
- Dias JCP 2002. O Controle da Doença de Chagas no Brasil. Em: O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul. Silveira AC *et al.* Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. 316p.
- Dias JCPD & Schofield 2009. History of Chagas Disease as a Public Health Problem in Latin America. In: History of Chagas Disease as a Public Health Problem in Latin America. Editores: Antonio Teixeira, Marina Vinaud, Ana Maria Castro. Editora: Bentham Science.
- Dias JCPD 1982. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 a 1982. (Tese), UFMG, 375 pp..
- Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*; 41(3):296-300.

- Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg*; 46, 616–623.
- Dice LR 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*; 26(3):297-302.
- Diotaiuti L 2007. Triatomíneos. Em:Doença de Chagas e Evolução. Org. Antonio Teixeira. Editora Universidade de Brasília: Finatec.
- Diotaiuti L 2009. Triatomines vectors os *Trypanosoma cruzi* infections. In *Emerging Chagas Disease*, A. Teixeira, M. Vinaud, and A. Maria Castro, Eds., pp. 24–39, Bentham Science Publishers.
- Diotaiuti L, Azeredo BV, Busek SC, Fernandes AJ 1998. Control of *Triatoma sordida* in rural peri-domestic environment of the Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Rev Panam Salud Publica*; 3(1):21-5.
- Diotaiuti L, Dias JC 1984. Occurrence and biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in palm trees of suburban areas of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 79(3):293-301.
- Diotaiuti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JC 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 35(3):237-45.
- Diotaiuti L, Penido CM, Pires HH, Dias JC 1995. Feeding and defecation dynamics of *Triatoma sordida*. *Rev Soc Bras Med Trop*;28(3):195-8.
- dos Santos CB, Leite GR, Melim Ferreira GE, Ferreira AL 2006. Natural infection of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) with flagellates morphologically similar to *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in Espírito Santo State. *Rev Soc Brasil Med Trop*; 39(1): 89–91,.
- dos Santos JR JE 2007. Avaliação da preferência alimentar e da infecção por *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) num fragmento de floresta em Porto Alegre, RS [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.
- dos Santos Júnior JE, Diotaiuti L, Dias JC 2011. First report of *Panstrongylus megistus* sylvatic focus in municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 106(4):510-3.
- Dotson EM, Beard CB 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Mol Biol*;10(3):205-15.
- Dujardin JP, Bermudes H, Schofield CJ 1997. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop*; 66: 145-153.
- Dujardin JP, Slice DE 2006. Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. In: *Encyclopedia of Infectious Disease – Modern Methodologies*.
- Dumonteil E, Tripet F, Ramirez-Sierra M J, Payet V, Lanzaro G, Menu F 2007. Assessment of



*Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan Peninsula of Mexico by morphometry and microsatellite markers. Am J Trop Med Hyg; 76: 930-937.

Feliciangeli MD, Sanchez-Martin M, Marrero R, Davies C, Dujardin JP 2007. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). Acta Trop;101(2):169-77.

Feliciangeli PD, Torrealba JW 1977. Observaciones sobre *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) en su biotopo silvestre *Copernicia tectorum*. Bol Dir Malariol Saneam Ambien; 17:198-205.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha AJ, Chiari E 1994. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Cadernos de Saúde Pública; 10(4): 473-480.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Pinto Dias JC, Romanha AJ, Chiari E 1989. Infecção natural das glândulas anais de gambas *Didelphis marsupialis* pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí - MG. Mem Inst Oswaldo Cruz 84: 87-93.

Fernandes O, Santos S, Junqueira A, Jansen A, Cupolillo E, Campbell D, Zingales B, Coura JR 1999. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (Suppl 1): 195-7.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg; 95(1):97-9.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg; 58(6):807-11.

Ferreira E, de Souza PS, da Fonseca Filho M, Rocha I 1986. Geographic distribution of *Triatoma vitticeps* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Bras Malariol Doencas Trop; 38:11-4.

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

Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil Rev Saude Publ; 14: 265-299.

Forattini OP, Barata JLS, Santos JLF, Silveira AC 1981. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na região nordeste do Brasil. Rev Saude Pub, 15: 113-164.

Forattini OP, Ferreira AO, Rocha e Silva EO & Rabello EX 1978. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XII – Variações mensais da tendência de *Panstrongylus megistus* à domiciliação. Rev Saude Pub; 12: 209-233.

- Forattini OP, Ferreira OA; da Rocha e Silva EO, Rabello EX 1975. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. VII — Permanência e mobilidade do *Triatoma sordida* em relação aos ecótopos artificiais. Rev. Saúde públ S.Paulo; 9: 467-76.
- Forattini OP, Rocha e Silva EO, Ferreira OA, Rabello EX, Pattoli DG 1971. Ecological aspects of trypanosomiasis: 3. Local dispersion of Triatominae with special reference to *Triatoma sordida*. Rev de Saude Publica; 5(2): 193–205.
- Forattini OP; Ferreira AO; Rocha e Silva EO, Rabello EX 1977a. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. VIII – Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e sua presença extradomiciliar. Rev Saude Pub; 12: 73-286.
- Forattini OP; Rocha E Silva EO; Rabello EX.; Santos JLF, Lima AR 1977b. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XI – Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e potencial enzoótico. Rev Saude Pub; 11: 527-550.
- Galvao C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa; 202: 1–36.
- Gamboa JC 1973. La población silvestre de *Rhodnius prolixus* en Venezuela. Arch Venez Med Trop Parasit Med; 5:321-352.
- Garcia AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard JR, Frame IA, Valente SA, Miles MA 1998. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol; 35(1):38-45.
- Garcia AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stthard JR, Frame IA, Valente SAS, Miles MA 1998. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology; 35(1): 38-45.
- Garcia BA, Manfredi C, Fichera L, Segura E L 2003. Short report: Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). Ame J Trop Med Hyg; 68: 692-694.
- Garcia BA, Zheng LB, de Rosas ARP, Segura EL 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). Mol Ecol Notes; 4:568-571.
- Gaunt M, Miles M 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz;95(4):557-65.
- Goetz SJ, Prince SD, Small J 2000. Advances in satellite remote sensing of environmental variables for epidemiological applications. Adv Parasitol;47:289-304.
- Gonçalves TC, de Oliveira E, Dias LS, Almeida MD, Nogueira WO, Pires FD 1998. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz;93(6):711-7.

- Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi P 1984. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 3356–3360.
- Gorla DE, Catalá SS, Grilli MP 1997. Efecto de la temperatura sobre la distribución de *Triatoma infestans* y es riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas na Argentina. Acta Toxicol Argent;5:15-62.
- Gürtler RE, Cecere MC, Canale DM, Castañera MB, Chuit R, Cohen JE 1999. Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. Acta Trop; 72(2):213-34.
- Gürtler RE, Cecere MC, Castanera MB, Canale D, Lauricella MA, Chuit R, Cohen JE, Segura EL 1996. Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dogs in northwest Argentina. Am J Trop Med Hyg; 55(1):24-31. Errata em: Am J Trop Med Hyg 1996 Oct,55(4):465.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Parasitology; 134: 1-14.
- Gürtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Lauricella MA, Chuit R, Segura EL 1998. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. Am J Trop Med Hyg, 58(6):748-58.
- Guimarães FN, Jansen G 1943. Novo transmissor silvestre do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas 1909). Mem Inst Oswaldo Cruz 38: 473-441.
- Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). Systematic Entomol; 28: 173-179.
- Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JBC, Santana DB, Cuba CAC 2008. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? Acta Tropica; 107(2): 90–98.
- Gurgel-Gonçalves R, Cuba-Cuba CA 2009. Predicting the potential geographical distribution of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) based on ecological niche modeling. J Med Entomol; 46:952-960.
- Gurgel-Gonçalves R, Ferreira JB, Rosa AF, Bar ME, Galvão C 2011. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. Med Vet Entomol; 25(1):84-93.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson T 2012. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. Journal of Tropical Medicine; *in press*.
- Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma AR, Abad-Franch F, CarranzaJC, Cuba Cuba CA 2004. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 46(6):323-30.

- Hadrys A, Balick M, Schierwater B 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*; 1:55-63.
- Harry M, Dupont L, Romana C, Demanche C, Mercier A, Livet A, Diotaiuti L, Noireau F, Emperaire L 2008. Microsatellite markers in *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Chagas' disease vector in Brazil. *Infect Genet Evol*; 8(5):672-5,
- Harry M, Poyet G, Romana CA, Solignac M 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the bloodsucking bug *Rhodnius pallescens* (Heteroptera Reduviidae). *Mol Ecol*; 7: 1784-1786.
- Harry M, Roose CL, Vautrin Noireau F, Romana CA, Solignac M 2008. Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infect Genet Evol*; 8:381-385.
- Hernández ML, Abrahan LB, Dujardin JP, Gorla DE, Catalá SS 2011. Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the arid Chaco (Western Argentina): spatial influence of macro- and microhabitats. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 11(5):503-13.
- Herrera L, Das Chagas Xavier S, Viegas C, Martinez C, Cotias PM, Carrasco H, Urdaneta-Morales S, Jansen AM 2004. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol*; 107(1-2):78-88.
- Higo H, Yanagi T, Matta V, Agatsuma , Cruz-Reyes A, Uyema N, Monroy C, Kanbara H, TADA I 2000. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in american continents: special emphasis on sexual reproduction in Central America. *Parasitology*; 121(4):403-8.
- Hillis DM & Dixon MT 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*;66(4):411-53.
- Hoare C 1972. The trypanosomes of mammals. Oxford: Blackwell Sient Publ.
- IBAMA 2006. [www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br). Acessado em 05/08/2006.
- IBAMA 2009. Plano de Manejo. Parque Nacional da Serra do Cipó e Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira. Encarte 1. Diretoria de Unidades de Conservação de Proteção Integral – DIREP. Brasília.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012. [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado em 27/02/2012.
- Jansen AM, Leon L, Machado G M, Silva MH, Souza-Leão SM; Deane MP 1991. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: Parasitological and serological follow-up of the acute infection. *Exp Parasitol*; 249-259.
- Jaramillo N, Castillo D, Wolff M 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*; 97(5): 667-673.

- Jaramillo N, Dujardin JP 2006. Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. Belo Horizonte. [texto da Disciplina Morfometria Geométrica – Curso de Pós-Graduação – Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz].
- Kitron U 1998. Landscape ecology and epidemiology of vector-borne diseases: tools for spatial analysis. *J Med Entomol*; 35:435-445.
- Kitron U, Michael J, Swanson J, Haramis L 1997. Spatial analysis of the distribution of LaCrosse encephalitis in Illinois, using GIS and local and global spatial statistics. *Am J Trop Med Hyg*; 57:469-475.
- Kitron U, Otieno LH, Hungerford LL, Odulaja A, Brigham WU, Okello OO, Joselyn M, Mohamed-Ahmed MM, Cook E 1996. Spatial analysis of the distribution of tsetse flies in the Lambwe Valley, using Landsat TM satellite imagery and GIS. *J Anim Ecol*; 65:371-380.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pavos S, Villablanca FX, Wilson AC 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86:6196-6200.
- Lent H. & Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) and their significance as vector of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*; 163: 125-520.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg*; 81(6):1041-9
- Liarte DB, Murta SM, Steindel M, Romanha AJ 2009. *Trypanosoma cruzi*: multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Exp Parasitol*; 123(4):283-91.
- Lima MM, Sarquis O, de Oliveira TG, Gomes TF, Coutinho C, Daflon-Teixeira NF, Toma HK, Britto C, Teixeira BR, D'Andrea PS, Jansen AM, Bóia MN, Carvalho-Costa FA 2012. Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 106(3):143-9.
- Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM 2000. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 95.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, 91-99., 1994.
- Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, Zingales B, Pena SD, Oliveira RP 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96(3):407-13.
- Machado EM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC 2000. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 95, 863–866.

- Madeira JA, Ribeiro KT, Oliveira JR, Nascimento JS, Paiva CL 2008. Distribuição espacial do esforço de pesquisa biológica na Serra do Cipó, Minas Gerais: subsídios ao manejo das unidades de conservação da região. *Megadiversidade*; 4 (1-2): 233-247.
- Maeda MH, Knox MB, Gurgel-Gonçalves 2012. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 45(1):71-6.
- Manne J, Nakagawa J, Yamagata Y, Goehler A, Brownstein JS, Castro MC 2012. Triatomine infestation in Guatemala: spatial assessment after two rounds of vector control. *Am J Trop Med Hyg*; 86(3):446-54.
- Marcet PL, Lehmann T, Groner G, Gürtler RE, Kitron U, Dotson EM 2006. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Heteroptera : Reduviidae). *Infect Gen Evol*; 6: 32-37.
- Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Miles M, Dujardin JP, Mas-Coma S 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol*; 1:225-235.
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Megallon-Gastelum E, Salazar-Shettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2001. The ITS-2 of the Nuclear as a Molecular Marker for Populations, Species, and Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mol Phylogenet Evol*; 18(1):136-142.
- Marcilla A, Canese N, Acosta E, López A, Rojas de Arias A, Bargues MD, Mas-Comas S 2000. Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Paraguay: a molecular analysis based on the second internal transcribed spacer of the rDNA. *Res Rev Parasitol*; 60: 99-105.
- Marques AC 1979. Controle de vetores da doença de Chagas. Experiência do Ministério da Saúde, Brasil. *In: Coletânea SUCAM*. Brasília, DF: Ministério da Saúde/Superintendência de Campanhas de Saúde Pública.
- Matias A, Riva JX De La, Torrez M, Dujardin JP 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia Identified by its Wings. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96(7):947-950.
- Miles MA, de Souza AA, Póvoa MM 1982. The ecotopy of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae) in the Horto Forest (Rio de Janeiro). *Rev Bras Biol*;42(1):31-5
- Moncayo A, Silveira AC 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104 (suppl 1): 17–30.
- Monteiro FA, Jurberg J, Lazoski C 2009. Very low levels of genetic variation in natural peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*; 81(2):223-7.
- Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C, Beard CB 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,94 Suppl 1:229-38.

- Moreno EC, Baracho L. Vigilância epidemiológica no Programa de Controle da Doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil (1984-1998). *Cad Saude Publica*; 2000;16 Suppl 2:113-6.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*; 27: 1477–1482.
- Moura ACM 2007. Reflexões metodológicas como subsídio para estudos ambientais baseado em análise de multicritérios. In: Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Florianópolis – SC, Brasil; v.1, p. 2899-2906.
- MS (Ministério da Saúde) 1994. Controle da Doença de Chagas Diretrizes Técnicas. Brasília: MS.
- Murta SMF, Romanha AJ 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94:177–180.
- Noireau F, Abad-Franch F, Valente SAS, Dias-Lima A, Lopes CM, Cunha V, Valente VC, Palomeque FS, Carvalho-Pinto CJ, Sherlock I, Aguilar M, Steindel M, Grisard EC, Jurberg J 2002. Trapping Triatominae in Sylvatic Habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 97(1): 61-63.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*; 40:26.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 94(1):23-7.
- O'connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol*; 7(5):587-93. .
- Oficina Sanitaria Panamericana. I Reunion de la Comision Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminacion de *T. infestans* y la Interrupcion de la Transmision la Tripanosomiasis Americana Transfusional. Buenos Aires: Ed.OPS (OPS/HCP/HCT/PNSP/92.18); 1992.
- Olivares-Villagómez D, Mccurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE 1998. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg*; 59: 563–570.
- Oliveira AW, Silva IG 2007. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop*; 40:204-208.
- Oliveira Filho AM 1989. New alternatives for the control of triatomines in peridomestic buildings. *Rev Soc Bras Med Trop*; 22:53-57.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 31;95(7):3776-80.
- Oliveira RP, Melo AI, Macedo AM, Chiari E, Pena SD 1999. The population structure of

*Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. Mem Inst Oswaldo Cruz.;94 (Suppl 1):65-70.

Pacheco RS, Almeida CE, Costa J, Klisiowicz DR, Mas-Coma S, Bargues MD 2003. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). Ann Trop Med Parasitol; 97(7):757-68.

Patterson JS, Barbosa SE, Feliciangeli MD 2009. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. Acta Trop; 110(2-3):187-99.

Paula MB, Costa IN, Freitas PDEA, Limongi JE, Pajuaba Neto ADEA, Pinto R de M, Gonçalves AL, Costa-Cruz JM 2010. Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. Rev Soc Bras Med Trop;43(1):9-14.

Pedreira de Freitas JL, Siqueira AF, Ferreira OA 1961. Investigações epidemiológicas sobre triatomíneos de hábitos domésticos e silvestres com o auxílio da reação de precipitina. Ver Inst Med Trop São Paulo; 2(2):525-542.

Pérez de Rosas AR, Segura EL, García BA 2007. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. Mol Ecol;16(7):1401-12.

Pessoa SB 1962. Habitats de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas. Arq Hig Saude Publica; 27:161-71.

Pickenhayn J, Guimaraes RB, Lima SC, Curto S 2008. Processo de urbanização da doença de chagas na Argentina e no Brasil. Rev Bras Geo Med Saude; 4:58-69.

Pires HHR, Borges EC, Andrade RE, Lorosa ES 1999. Peridomiliary Infestation with *Triatoma sordida* Stal, 1859 in the County of Serra do Ramalho, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz; 94:147-149.

Rabinovich JE, Carcavallo RU, Barretto MP 1976. Ecologic methods: marking, trapping, and sampling for vector studies in the field. In *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*, PAHO scientific publication 318, Washington, p. 16-20.

Rassi Júnior A, Rassi A, Marin-Neto JA 2010. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375: 1388–402

Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. Trop Med Int Health;12(6):759-64.

Rodrigues BA, Mello GB 1942. Contribuição ao estudo da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 37: 77-94.

Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ 2009. Genetically different isolates of *Trypanosoma cruzi* elicit different infection dynamics in raccoons (*Procyon lotor*) and Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). Int J Parasitol;39(14):1603-10.

Rogers DJ AND Williams BG 1993. Monitoring trypanosomiasis in space and time. Parasitol;



106:S77-S92.

Rossell-Reyes O 1984. A Comparison of the Feeding Performances of *Rhodnius prolixus* Stål and *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera: Triatominae). PhD Thesis, University of London, 339 pp.

Rosypal AC, Corte's-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS 2007. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Vet. Parasitol*; 149:172–177.

Rosypal AC, Hill R, Lewis S, Barr SC, Valadas S, Gennari SM, Lindsay DS 2011. Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in dogs experimentally infected with isolates obtained from opossums (*Didelphis virginiana*), armadillos (*Dasyus novemcinctus*), and dogs (*Canis familiaris*) from the United States. *J Parasitol*;97(1):140-3.

Sanchez G, Wallace A, Muñoz S, Venegas J, Ortiz S, Solari A 1993. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by several molecular markers supports a clonal mode of reproduction. *Biol Res*;26(1-2):167-76.

Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gürtler RE 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol*; 41:643-649.

Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gürtler RE 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol*;41(4):643-9.

Schofield CJ & GALVÃO C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*; 110 (2-3): 88-100.

Schofield CJ 1988. The biosystematics of Triatominae. pp 284-312 in: *Biosystematics of Haematophagous Insects* (ed. MW Service). Systematics Association special volume 37. Oxford, UK: Clarendon.

Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;94 Suppl 1:375-8.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*; 22(12):583-588.

Shaw J, Lainson R, Fraiha H 1969. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica* 3: 153-157.

Silva EO, Rodrigues VL, Silva RA, Wanderley DM 2011. Control Program of Chagas disease in São Paulo, Brazil: the control and surveillance of vector transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*; 44 (2):74-84.

Silva NN, Clausel DT, Nolibus H, Mello AL, Ossanai J, Rapone T, Snell T 1968. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 10:265-

276,.

Silva RA, Bonifácio PR, Wanderley DM 1999. Chagas' disease in São Paulo State: a comparative study between systematic search and inhabitants report of bugs in the area under entomological surveillance. *Rev Soc Brasil Med Trop*; 32(6): 653–659.

Silveira AC & Dias JCP 2011. O controle da transmissão vetorial. *Rev Soc Brasil Med Trop*; 44:52–63.

Silveira AC 2000. Current situation with chagas disease vector control in the Americas. *Cad Saude Publica*, 16 (Suppl 2):35-42.

Silveira AC, Souza PC, Silveira Netto HV 1993. Importância de espécies secundárias de triatomíneos na transmissão domiciliar da doença de Chagas no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *In: XXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Rev Soc Bras Med Trop*; 26 (supl I):200.

Silveira AC, Vinhaes M 1998. Chagas disease: the epidemiological and control aspects. *Rev Soc Bras Med Trop*;31 (Suppl) 2:15-60.

Silveira AC, Vinhaes MC, Lira E, Araújo E 2001. O controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. I. Estudo do tempo de reposição das condições de transmissão em áreas submetidas a tratamento químico domiciliar, e de variáveis ambientais relacionadas. Brasília, DF: Organização Panamericana da Saúde.

Simon C, Paabo S, Kocher TD, Wilson AC 1999. Evolution mitochondrial ribosomal RNA in insects as a show by the polymerase chain reaction. *In: Molecular Evolution. Clegg M, O'Brien S (orgs.), UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, 122, 235-244. Wiley-Liss, New York.*

Sneath PHA, Sokal AR 1962. Numerical taxonomy. *Nature*; 193:853-860.

Sneath PHA, Sokal RR 1973. Numerical Taxonomy. Principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, XV.

Soares RPP, Barbosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L 2001. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. *Bioch Gen*; 39(1/2): 1-13.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitol*; 83 (2): 141-152.

Stevens J, Noyes H, Schofield CJ, Gibson W 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*; 48: 1-53.

Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAN), Divisão de Doença de Chagas 1980. Manual de Normas Técnicas da Campanha de Controle da Doença de Chagas. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 167p

Szumlewicz AP 1975. Laboratory colonies of Triatominae, Biology and population dynamics.

In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Belo Horizonte, Brazil: Pan American Health Organization; PAHO Scientific Publication 318:63-82.

Szumlewicz AP, Muller CA, Moreira CJC 1988. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas disease: 3. On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to the infection by *T. cruzi*. Rev Saíde Publ; 22 (5): 390-400.

Teixeira A 2007. Os jogos eônicos. In: Teixeira A. Doença de Chagas e evolução. Brasília: Editora UNB.

Teixeira AR, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, Nascimento R, Vexenat CA, Silva AR, Ault SK, Costa JM 2001. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. Emerg Infect Dis; 7(1):100-12.

Thompson RA, Wellington DE, Oliveira-Lima J, Maguire JH, Braud DH, Scholl DT 2002. Climatic and demographic determinants of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil using remote sensing technology for environmental categorization of rain and region influences on leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg;67:648-55.

Tibayrenc M, Solignac M, Cariou ML, le Ray D, Desjeux P 1984. Isoenzymatic strains of *Trypanosoma cruzi*: recent or ancient, homogeneous or heterogeneous origin? C R Acad Sci III;299(7):195-8.

Tonn RJ, Carcavallo RU, Ortega R, Carrasquero B 1976. Métodos de estudio de triatominos en el medio silvestre. Bol Dir Malariai Saneam Ambien 16: 146-152.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H 2009. *Leishmania spp.* and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol; 164:118-123

Vianna, Elisa Neves. Dinâmica de reinfestações por triatomíneos e alterações ambientais na ecoepidemiologia da doença de Chagas em área de *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no norte de Minas Gerais, Brasil. [manuscrito] / Elisa Neves Vianna. – 2011 280 f. : il. 29,5 cm. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). Inf Gen Evol; 2: 121-128.

Villela MM, Rodrigues VL, Casanova C, Dias JC 2010. Analysis on the food source of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its present importance as a vector for *Trypanosoma cruzi*, in the State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop; 43(2):125-8.

Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BV, Dias JC 2005. Entomological surveillance for Chagas disease in the mid-western region of Minas Gerais State, Brazil, from 2000 to 2003. Cad Saude Publica; 21(3):878-86.

Villela MM, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP 2009. Evaluation of the Chagas disease control program and presence of *Panstrongylus megistus* in centralwestern Minas Gerais state, Brazil. *Cad Saude Publica*; 25(4): 907–917.

Vinhaes MC, Dias JC 2000. Chagas disease in Brazil. *Cad Saude Publica*;16 (Suppl 2):7-12.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Ame J Trop Med Hyg*; 68: 574–582.

Whitlaw JT, Chaniotis BN 1978. Palm trees and Chagas' disease in Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 27: 873-881.

WHO 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series no 905. Geneva: World Health Organization,.

WHO, World Health Organization 2012. [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/). Acessado em 27/02/2012.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JÁ & Tingey SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*; 18(22):6531-6535.

Xavier SC, Vaz VC, D'Andrea PS, Herrera L, Emperaire L, Alves JR, Fernandes O, Ferreira LF, Jansen AM 2007. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitol Int*; 56(2):119-28.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol*;35(2):225-33.

Yeo M, Lewis MD, Carrasco HJ, Costa NA, Llewellyn M, Valente SAS, Valente VC, Arias AR, Miles MA 2007. Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int J Parasitol*; 37 (1): 111–120.

Zeledón R; Solano G; Saenz G, Swartzwelder JC 1970. Wild reservoirs of *T.cruzi* with special mention of the opossum, *D. marsupialis*, and its role in the epidemiology of Chagas disease in a endemic area of Costa Rica. *J Parasitol*; 56(1):38.



## 8.1 Licenças



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 14903-2</b>	<b>Data da Emissão: 29/04/2009 14:32</b>	<b>Data de Validade: 29/04/2010</b>
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2353502	Nome: Carlota Josefovicz Belisário	CPF: 044.200.446-08
Título do Projeto: Padrão de infestação e análise espaço-temporal da origem da reinfestação por <i>Panstrongylus megistus</i> , após borrifação com inseticida.		
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Liléia Gonçalves Diotaluti	Orientadora	250.335.656-72	M305938 SSPMG-MG	Brasileira
2	Gustavo Fontes Paz	Médico Veterinário	027.999.166-51	M7006563 SSP-MG	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JABOTICATUBAS	MG	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CIPO	UC Federal
2	JABOTICATUBAS	MG	Jaboticatubas	Fora de UC
3	SANTANA DO RIACHO	MG	Santana do Riacho	Fora de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Callitrix, Didelphimorphia, Hemiptera, Rodentia
2	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Arecaceae (*Qtde: 30)
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Hemiptera, Didelphimorphia, Rodentia, Callitrix
4	Marcação de animais silvestres in situ	Didelphimorphia

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

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele
2	Amostras biológicas (Primates)	Sangue, Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 81851599**



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 14903-2</b>	<b>Data da Emissão: 29/04/2009 14:32</b>	<b>Data de Validade: 29/04/2010</b>
------------------------	--	-------------------------------------

#### Dados do titular

Registro no Ibama: 2353502	Nome: Carlota Josefovicz Belisário	CPF: 044.200.446-08
Título do Projeto: Padrão de infestação e análise espaço-temporal da origem da reinfestação por <i>Panstrongylus megistus</i> , após borrifação com inseticida.		
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ		CNPJ: 33.781.055/0008-01

3	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual, Armadilha de interceptação de voo
4	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
5	Método de captura/coleta (Primates)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	Instituição de pesquisas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 81851599**



Página 2/3







Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz

 Vice-presidência de Pesquisa e  
 Laboratórios de Referência

**Comissão de Ética  
 no Uso de Animais**

# CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

*"Padrão de infestação e análise espaço-temporal da reinfestação por *Panstrongylus megistus*, após borrifação com inseticida" sob o número P-442/07, proposto por Liléia Diotaiuti, foi licenciado pelo Nº L-032/09.*

Sua licença autoriza o uso anual de:

- 60 *Rodentia*
- 40 *Primates*
- 30 *Gallus gallus*
- 60 *Didelphimorphia*
- 1300 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ).

Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 25 de maio de 2013.

Rio de Janeiro, 18 de junho de 2009.

**Dra. Norma Vollmer Labarthe**

**Coordenadora da CEUA**

**FIOCRUZ**

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
 Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ  
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

## **8.2 Extração de DNA a partir de sangue de cães utilizando o kit de extração de DNA genômico Wizard (Promega)**

- 1- Colocar 700µl da Solução de Lise Celular nos microtubos.
- 2- Acrescentar 200µl de amostra de sangue e homogeneizar com a própria ponteira.
- 3- Agitar durante 10 minutos.
- 4- Centrifugar durante 1 minuto e 30 segundos á 14.000 RPM.
- 5- Descartar o sobrenadante e limpar a boca do tubo com papel.
- 6- Dar um Vortex de 15 segundos.
- 7- Adicionar 200µl de solução de Lise Nuclear.
- 8- Adicionar 75µl de solução de Precipitação Protéica.
- 9- Dar um Vortex de 30segundos.
- 10- Centrifugar durante 4 minutos.
- 11- Acrescentar aos novos microtubos 200µl de isopropanol.
- 12- Retirar o sobrenadante (parte líquida) e adicionar aos novos tubos com o isopropanol.
- 13- Homogeneizar durante 1 minuto e centrifugar por 1 minuto.
- 14- Verter os tubos e descartar o conteúdo. Secar a boca dos tubos com papel.
- 15- Dar um Vortex de 15 segundos.
- 16- Adicionar 200µl de álcool 70%.
- 17- Homogeneizar por 1 minuto e centrifugar por 1 minuto.
- 18- Descartar o conteúdo.
- 19- Dar um spin.
- 20- Retirar 30µl do que resta no tubo e colocar para secar.
- 21- Adicionar 100µl de solução de Reidratação de DNA.
- 22- Deixar 24h a temperatura ambiente.

### **8.3 Extração de DNA a partir de patas de triatomíneos utilizando o kit de extração de DNA genômico Wizard (Promega)**

1. Colocar a pata em um microtubo.
2. Adicionar 300µl da solução de Lise Nuclear e macerar a pata com auxílio de um pistilo.
3. Deixar à temperatura ambiente ou no multi-block (56°C – 30min) até a solução se tornar viscosa (com bolhas).
4. Adicionar 100µl da solução de Precipitação Protéica e vortex vigorosamente por 20 a 30 segundos.
5. Centrifugar a 14000 rpm por 3 min à temperatura ambiente.
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 300µl de isopropanol e homogeneizar por 20min- 10 min de cada lado.
7. Centrifugar a 14000 rpm à temperatura ambiente por 6 min.
8. Descartar o sobrenadante, adicionar 300µl de etanol 70% e homogeneizar por 5 min de cada lado.
10. Repetir os passos 7 (1 minuto) e 8, centrifugar mais um 1 minuto.
11. Aspirar cuidadosamente o etanol (com pipeta) e colocar o microtubo no multi-block até a evaporação total do etanol.
12. Adicionar 70µl da solução de hidratação de DNA e incubar a 65°C (ou até mais de 50°C) por 1h ou deixar “overnight” a temperatura ambiente.

**Anexo 8.4** Dados de capturas de triatomíneos em unidades domiciliares de Jaboticatubas, Minas Gerais, no período de setembro/2007 a outubro/2010 e as populações utilizadas para o estudo de RAPD

localidade	número	local captura	adultos	ninfas	total	espécie	data	coordenada da localidade	RAPD
Alto do Rótulo	casa 01	galinheiro	1	0	1	<i>P. megistus</i>	18/05/2009	-19.29278 -43.76558	
Alto Geraldo Correia	casa 09	galinheiro	0	1	1	<i>P. megistus</i>	09/05/2008	-19.45482 -43.88838	*
Barreiro da Paciência	casa 35	galinheiro	0	3	3	<i>P. megistus</i>	03/07/2008	-19.55038 -43.73229	*
Barreiro do Papagaio	casa 3	galinheiro	35	23	58	<i>P. megistus</i>	17/09/2007	-19.36110 -43.68320	*
Boa Vista	casa 111	galinheiro	1	8	9	<i>P. megistus</i>	15/07/2010	-19.30737 -43.72131	
Boiça	casa 9	paiol	18	39	57	<i>P. megistus</i>	17/10/2007	-19.52877 -43.67888	
Bom Jardim (pov.)	casa 11	galinheiro	0	22	22	<i>P. megistus</i>	14/07/2009	-19.48115 -43.67553	
	casa 17	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	11/11/2008		*
Bom Jardim (faz.)	casa 7	galinheiro	15	2	17	<i>P. megistus</i>	25/09/2007	-19.30350 -43.73687	*
Borges	casa 1	galinheiro	5	0	5	<i>P. megistus</i>	16/10/2007	-19.52323 -43.66980	*
Buraco	casa 6	galinheiro	1	0	1	<i>P. megistus</i>	29/10/2007	-19.50885 -43.67161	
Capão Alto	casa 08	galinheiro	0	1	1	<i>P. megistus</i>	18/05/2009	-19.47095 -43.79993	*
Capão da Horta	casa 04	galinheiro	1	0	1	<i>P. megistus</i>	20/03/2008	-19.48807 -43.79970	
Capão das Pedras	casa 02	galinheiro	1	0	1	<i>T. sordida</i>	18/05/2009	-19.35498 -43.74774	
	casa 03 c2	galinheiro	2	0	2	<i>T. sordida</i>	18/05/2009		
Capão do Buriti	casa 04	galinheiro	0	11	11	<i>P. megistus</i>	28/05/2009	-19.32256 -43.74261	
Capão dos Moreiras	casa 07	galinheiro	0	7	7	<i>P. megistus</i>	14/06/2008	-19.44634 -43.74893	*

localidade	número	local captura	adultos	ninfas	total	espécie	data	coordenada da localidade	RAPD
Capão Grande II	casa 8	galinheiro	9	2	11	<i>P. megistus</i>	20/09/2007	-19.54739 -43.65994	*
Capão Martins	casa 02	galinheiro	1	3	4	<i>T. sordida</i>	14/07/2009	-19.43316 -43.74843	
Casas Novas	casa 07	galinheiro	1	0	1	<i>P. megistus</i>	14/07/2009	-19.39985 -43.63329	
Chácara	casa 01	outros	0	1	1	<i>P. megistus</i>	15/07/2010	-19.33787 -43.66644	
Chirú	casa 35	galinheiro	1	5	6	<i>P. megistus</i>	19/10/2009	-19.33813 -43.66583	
Cruz de Minas	casa 08	galinheiro	0	1	1	<i>P. megistus</i>	15/07/2010	-19.31468 -43.79491	
Derrubada	casa 1	galinheiro	1	0	1	<i>P. megistus</i>	08/10/2007	-19.48983 -43.67630	*
Espada	casa 10 c1	galinheiro	2	19	21	<i>P. megistus</i>	15/07/2010		*
	casa 20	galinheiro	0	2	2	<i>P. megistus</i>	19/10/2009	-19.27596 -43.71062	*
	casa 21	galinheiro	10	2	12	<i>P. megistus</i>	17/09/2007		*
Felipe	casa 10	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	06/11/2008		*
	casa 15	quarto	0	1	1	<i>P. megistus</i>	23/06/2008	-19.50317 -43.66536	*
Guarazinho	casa 04	quarto	1	2	3	<i>P. megistus</i>	19/09/2008		*
	casa 06	quarto	4	2	6	<i>P. megistus</i>	19/09/2008	-19.31108 -43.76950	*
José Dias	casa 06	galinheiro	0	1	1	<i>P. megistus</i>	10/06/2008	-19.37040 -43.65950	*
Lapa	casa 06	quarto	0	15	15	<i>P. megistus</i>	14/01/2008	-19.52242 -43.72747	*
Lapinha	casa 13	galinheiro	0	8	8	<i>P. megistus</i>	14/07/2009		
	casa 20	galinheiro	0	1	1	<i>P. megistus</i>	23/06/2008	-19.37832 -43.66367	
			1	0	1	<i>T. sordida</i>			

localidade	número	local captura	adultos	ninfas	total	espécie	data	coordenada da localidade	RAPD
Laranjeiras I	casa 03	paiol	0	9	9	<i>P. megistus</i>	07/08/2008	-19.24123 -43.75213	*
Laranjeiras II	casa 07	galinheiro	1	0	1	<i>T. sordida</i>	09/05/2008	-19.47318 -43.87117	
		galinheiro	4	2	6	<i>T. sordida</i>	28/05/2009		
Mandim	casa 08	galinheiro	0	2	2	<i>P. megistus</i>	19/04/2008	-19.49483 -43.71892	*
Minério	não identificado	galinheiro	1	3	4	<i>P. megistus</i>	11/03/2009	-19.44348 -43.61786	
Santa Margarida	casa 01	galinheiro	0	1	1	<i>P. megistus</i>	29/04/2009	-19.56390 -43.87437	
Santo Antônio	casa 14	galinheiro	3	10	13	<i>P. megistus</i>	20/10/2007	-19.53796 -43.90941	
	casa 8	depósito	61	7	68	<i>P. megistus</i>	17/10/2007		
São Benedito	casa 90	sala	1	0	1	<i>P. megistus</i>	03/10/2007	-19.514 -43.7461	*
São José	casa 17	quarto	0	5	5	<i>P. megistus</i>	15/07/2010	-19.53309 -43.71096	
	casa 19 c1	galinheiro	0	3	3	<i>P. megistus</i>	15/07/2010		
São José da Serra	casa 18	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	25/01/2009	-19.44320 -43.63388	
		paiol	2	4	6	<i>P. megistus</i>	25/01/2009		
		galinheiro	2	1	3	<i>P. megistus</i>	25/01/2009		
Suma	casa 07 c2	galinheiro	0	9	9	<i>P. megistus</i>	18/05/2009	-19.33140 -43.76702	
Terra Vermelha	não identificado	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	17/03/2009	-19.29760 -43.74683	*
Vargem do Juá	casa 04 c1	galinheiro	15	0	15	<i>T. sordida</i>	28/05/2009	-19.47458 -43.83572	
Vargem do Juá I	casa 04	galinheiro	7	0	7	<i>T. sordida</i>	17/04/2009	-19.47875 -43.84225	

localidade	número	local captura	adultos	ninfas	total	espécie	data	coordenada da localidade	morfometria	RAPD
Vargem Grande	casa 54	galinheiro	0	8	8	<i>P. megistus</i>	17/11/2008	-19.36322 -43.72869		
	casa 63	galinheiro	16	6	22	<i>P. megistus</i>	12/11/2008			*
		galinheiro	0	2	2	<i>P. megistus</i>	29/04/2009			*
	casa 18	galinheiro	4	6	10	<i>P. megistus</i>	17/04/2009			*
Vereda	casa 12	galinheiro	0	2	2	<i>P. megistus</i>	15/07/2010	-19.47367 -43.87970		

**Anexo 8.5** Dados de capturas de triatomíneos em unidades domiciliares de Santana do Riacho, Minas Gerais, no período de setembro/2007 a outubro/2010

localidade	número da casa	local captura	adultos	ninfas	total	espécie	data
Centro	casa 418	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	13/11/2007
	não identificado	quarto	1	0	1	<i>T. sordida</i>	18/09/2008
Cipó Abaixo	não identificado	paiol	6	5	11	<i>P. megistus</i>	17/11/2008
	não identificado	quarto	2	0	2	<i>T. sordida</i>	19/10/2009
	casa 40	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	23/11/2007
	casa 06	depósito	5	1	6	<i>P. megistus</i>	01/04/2008
Curral Queimado	casa 31	galinheiro	1	3	4	<i>P. megistus</i>	03/10/2007
	casa 33	galinheiro	10	3	13	<i>P. megistus</i>	03/10/2007
	casa sn	sala	1	0	1	<i>P. megistus</i>	19/11/2007
	casa 30	galinheiro	2	0	2	<i>P. megistus</i>	22/10/2007
Fundo do Saco	casa 11	sala	1	0	1	<i>P. diasi</i>	07/08/2008
Galho Grande	não identificado	galinheiro	4	1	5	<i>P. megistus</i>	14/07/2009
		quarto	1	1	2	<i>P. megistus</i>	10/02/2008
Lapinha de Baixo	não identificado	quarto	1	1	2	<i>P. megistus</i>	16/12/2009
	não identificado	paiol	1	0	1	<i>P. megistus</i>	19/10/2009
Laranjeira	não identificado	galinheiro	3	8	11	<i>P. megistus</i>	15/07/2010
Rio de Pedras	casa 3	sala	1	0	1	<i>T. vitticeps</i>	19/10/2009



localidade	número da casa	local captura	adultos	ninfas	total	espécie	data
Serra do Cipó	casa 05	quarto	2	2	4	<i>P. megistus</i>	23/11/2007
		cozinha	1	0	1	<i>P. megistus</i>	15/10/2007
	não identificado	quarto	1	0	1	<i>P. megistus</i>	11/03/2010
		sala	0	1	1	<i>P. megistus</i>	23/08/2010
	não identificado	intradomicílio	1	0	1	<i>P. megistus</i>	17/04/2009
	não identificado	não identificado	0	1	1	<i>P. megistus</i>	06/10/2010
Serra Morena	não identificado	silvestre	1	0	1	<i>P. megistus</i>	29/01/2007
		galinheiro	0	7	7	<i>P. megistus</i>	23/09/2009
	não identificado	não identificado	2	0	2	<i>P. megistus</i>	20/10/2009

**Anexo 8.6** Sequências consenso de ITS-2 do rDNA de *Panstrongylus megistus*

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J01\_01

GATGCGTGAGAGAGCGCAACTCGGCGTCGTCATGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACACTTTGA  
ACGCACATTGCGGCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCTGTTAATAATAAGAAATT  
TTTTTATTTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATATTGGAAAT  
TTTCTGTTGTCTCGCGCAACATTTATTTGTTGTGTGTGCAACAGTATTTCTAAATACACTTGTGTATATCCT  
TTCTTTTGGCTAATAGTATTTCTCTGATATACTTGGTTTTTTTTTCTCTTTTTAAAGCGCATAGTTTCAATAT  
GGAAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTAAATGTTTAAACAAAGAAGG  
GGAATTTTTTTCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGATCTACGAT  
TCCATTTACTTTTGAGAGTTAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGTATTTTTAAACTGCTCTGCAG  
AAAAAAAAATATAGTGAAGTAGATATGAATAATTACTCAGATTTTCAAATAGTACATATTGTATCACAAC  
TGTGTAATAAAAAGGATATAAACCAGTTTTTGAGAAATTTCAATTGAATGGCAACACAAAACTTG  
TATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTCCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGGAAAAGAA  
ACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCAAAGCAT  
TGCTTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTGCCCCAAGTC  
CATCTGAACGAGGCCACGGTCCCGAGAGGGTGCCAGCCCAAGATGCGATCCTATTCCGGTGCTCACAT

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J01\_02

CCTGTGGTTCGATGAAGACGCAGCAACTGCGCGTCGTCATGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACA  
CTTTGAACGCACATTGCGGCCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCTGTTAATAATA  
AGAAATTTTTTATTTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATT  
GGAAATTTTCTGTTGTCTCGCGCAACATTTATTTGTTGTGTGTGCAACAGTATTTCTAAATACACTTGTGT  
ATATCCTTTCTTTTGGCTAATAGTATTTCTCTGATATACTTGGTTATTTTTCTCTTTTTAAAGCGCATAGTT  
TCAATATGGAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTAAATGTTTAAACAAA  
GAAGGGGAATTTTTATCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGATC  
TACGATTCCATTTACTTTTGAGAGTTAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGTATGGTTAAACTGCT  
CTGCAGAAAAAAAAATATAGTGAAGTAGATATGAATAATTACTCAGATTTTCAAATAGTACATATTGTAT  
CACAACGTGTAAAATAAAAAGGATATAAACCAGTTTTTGAGAAATATTTCAATTGAATGGCAACACAAA  
AACTTGTATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTCCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGGAA  
AAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCAA  
AGCATTGCTTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTGCCCC  
AAGTCCATCTTGAACGAGGCCACAGTCACCGAAGAGGGTGCCAGGCCCGTGATGGCAAAGCTATTTTC  
GGTGCTCA

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J01\_03

CTGTTGTCGATGAAGACGCAGCAACTGCGCGTCGTCATGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACA  
CTTTGAACGCACATTGCGGCCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCTGTTAATAAT  
AAGAAATTTTTTATTTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATA  
TTGGAAATTTTCTGTTGTCTCGCGCACCATATATATGTGGTGTGTGCAACAGTATATCTCATATACACTTGT  
GTATATCCTCTCTTGGGTAATATTATATCTCTGATATATTGGGGTTTTTTTTCTCTCTTAAAGCGCATAGT  
TTCAATATGGAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTAAATGTTTAAACAA  
AGAAGGGGAATTTTTTTCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGAT  
CTACGATTCCATTTACTTTTGAGAGTTTAAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGTATTTTTAAACTGC  
TATGCAGAAAAAAAAATATAGTGAAGTAGATATGAATAATTACTCAGATTTTCAAATAGTACATATTGTA  
TCACAACGTGTAAAATAAAAAGGATATAAACCAGTTTTTGAGAAATATTTCAATTGAATGGCAACACAA  
AACTTGTATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTCCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGGA  
AAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCAA  
AAGCATTGCTTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTGCCCC  
AAAGTCCATCTTGAACGAGGCCACGGTCCCGAGAGGGTGCCAGGCCCGTGATGGCAAAGCTATTTTCG  
GTGCTCATCTCGCGGC

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig2

GAGGCACCGAATAGGCTTGCATCACGGGCCTGGCACCCCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGG  
ACTTGGGGCGAAATGCACATATCTCGGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAAAGCAAT  
GCTTTTGGGATTCAGTGCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGGTTTC  
TTTTCCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCACCTAATCTGAGGTCGAAAATAAAAG  
TTTTTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAACCTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTG  
ATACAATATGACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCCGGCTAA  
GCAGTTTAAAATTACGGTGGATTTTTTATTATTGGGATTGGGTTAACTTCTCAAAGTTAATTGGATTTCGT  
AAATCATGGTTTAAATCCGGGACGGGAAAAATTCGCCCAAACCTTGGCCTAAATGCAAAAAAATTTCCCC  
TTCTTGTTAAACCATTTTATTATTACTGGAGATTTAATAACCATTATTCCAAGATACCAATTTTCCTTA  
TGGAACCTTAGGCGCTTAAACAGGGATCAAACCAGGTTTTTCGGAAAATTCATTAGCAAAGAAGGTATA  
CCAGTGTTCCTCAATCGGTGCCCAACAACACTATTG

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J06

TGAGCACCAATAGCTTGCATCACGGGCCTGGCACCCCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGGA  
CTTGGGGCGAAATGCACATATCTCGGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAAAGCAATG  
CTTTTGGGATTCAGTGCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGGTTTCTT  
TTCCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCACCTAATCTGAGGTCGAAAATAAAAGTT  
TTTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAACCTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTGAT  
ACAATATGACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTATATCTGCATAGCA  
GTTTAAAATAACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAACTCTCAAAGTAAATGGAATCGTAGA  
TCATTGTATTATACAGGAAGGGAAAAATCGCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAAATTTCCCTTCTT  
AGT

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig2\_J06

TGGTCATGAAGACGCAGCAACTGCGCGTCGTCATGTGAACTGCAGGACACATGAACATCGACACTTTG  
AACGCACATTGCGGCCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCGTTAATAAAGAAA  
TTTTTTTTATTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATATTGGAA  
ATTTTCTGTTGTCTCGCGCAAATATATATGTGGTGTGTGCAAAACAATATCTATATATACATGTGTATATAT  
TCTCTCTTGGGTAATATTATATCTCTGATATATAAGGGGTTTTTTTTCTCTCTTTAAAGAGCATATAGTCAAA  
ATGAGAGAAATGTGATCTGGGTATATAGGGGAATAAAAAATTCGTGTATTATAGAAATGTGTAACACAAA  
AAAGGGGAAAATTTTTACGATCTCTGACGCAGTCTGGGCGCAAATTATTCCCCCTCCGTGATAAAAC  
AAATGTTTATATAAGACCCATAGTACACTTTTCGAGAGAAATAGCCACAAACCCTATAAATAAATATTATAT  
TATCAGTGTATTATATAAATGTTGCTTGTGGAAAAAATAAATAAATAGATGTGATATGTAATATGTGAAT  
AAAAAATACAAAGATATG

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J07\_04

GCCGGTTCGAGAAGACGCAGCAACTGCGCGTCGTCATGTGAACTGCAGGACACATGAACATCGACA  
CTTTGAACGCACATTGCGGCCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCGGTAAGTAAT  
AAGAAATTTTTTATTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATA  
TTGAAATTTTCTGTTGTCTCGCGCAACATTTATTTGTTGTGTGTGCAACAGTATTTCTAAATACACTTGT  
GTATATCCTTTCTTTTGGCTAATAGTATATCTCTGATATACTTGGTTTTTTTTTCTTTTTTAAAGCGCATAG  
TTTCAATATGGAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTGAATGTTTAAACA  
AAGAAGGGGAATTTTTTTCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGA  
TCTACGATTCCATTTACTTTTTGAGAGTTTAAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGTATTTTTAACTG  
CTCTGCAGAAAAAATAATAGTGTAAAGTAGATATGTAATAATTAAGTATTTTCAATAGTACATATTGT  
ATCACAACCTGTGTAATAAATAAAGGATATAAACCAGTTTTTGGAGAAATATTTCAATTGAATGGCAACACA  
AAAATTTTTATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTTCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGG  
AAAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCA  
AAAGCATTGCTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTTCGC  
CCAAGTCCATCTTGAACGAGGCCACGGTCCCGAGAGGGTGCCAGGCCCGTGATGGCAAGGCATATTTTC  
GGTGCCTC

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J07\_05

CACGAAATAGGCTTGCCATCACGGGCTGGCACCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGGACTT  
GGGCGAAATGCACATATCTCGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAAAGCAATGCT  
TTTGGGATTCAGTGCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGTTTCTTTT  
CCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTCGAAAATAAAAGTTTT  
TGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTGATAC  
AATATGTAATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCTGCATAGCAG  
TTTAAAAATACAGCTGATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAAGTAAATGGAATCGTAGAT  
CATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTTCCCTTCTTT  
GTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCCATATTGAAAC  
TATGCGCTTTAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGATATACTATTAGCCAAGAGAGAGGATA  
TACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACCACATATATATGTTGCGCGAGACAACAGAAAATTT  
CCAATATATATACATTATAAAATGTATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTATTTAAAAATAAAAAAAT  
TTCTTATTATAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTGGATAGAATGCCAGGGCCGCAATGTGCGTT  
CAAAGTGTGATGTTTTCATGTGCTCCTGCAGTTCACATGACGACGCGCAGTTGCTGCGTCTTCTAACATC

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J07\_06

GTCCAGTGCAGAGAGCAGCAACTGCGCGTGCATGTGAACTGCAGGACACATGAACATCGACACTTT  
GAACGCACATTGCGGCCCTGGTATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCGTTAATAATAAGA  
AATTTTTTATTTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATTGG  
AAATTTTCTGTTGTCTCGCGCACCATATATTTGTGGCTGTGTGCAACAGTATATCTAAATACACTTGTGTAT  
ATCCTTTCTTTGGGTAATAGTATTTCTCTGATATACTTGGGTTTTTTTTCTCTTTAAAGCGCATAGTT  
TCAATATGGAAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTGAATGTTTAAACAAA  
GAAGGGGAATTTTTTCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGATC  
TACGATTCCATTTACTTTTGAGAGTTTAAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGATTTTTAAACTGCT  
ATGCAGAAAAAAAATATAGTGAAGTAGATATGTAATAATTACTCAGATTTTCAATAGTACATATTGTAT  
CACAACACTGTGTAATAAAAAGGATATAAACCAGTTTCTGAGAAATATTTCAATTGAATGGCAACACAAA  
AACTTTTATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTCCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGGAA  
AAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCAA  
AGCATTGCTTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTGCCC  
AAGTCCATCTTGAACGAGGCCACAGGTCCCAGAGGGGTGCCAGGCCCGTGTATGGCAGTCTATTTCGG  
CTCCTATCTTTGTTTGTGTA

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J20\_02

GCGGTCAGAACAATCGCGTCGTATGTGACTGCAGACACATGAACATCGACACTTTGAACGCACATT  
GCGGCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCGTTAATAATAAGAAATTTTTTATTTT  
TTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATATTGGAAATTTCTGTTGT  
CTCGCGCAACATTTATTTGTGGTGTGTGTACCAGTATATCTAAATACACTGTTGTGATATCCTCTCTTGG  
GCTAATAGTATATCTCTCATATATTTGGGGTTGTTTTCTCTTTAAAACGCGTAGTTTCACTATGGTAAA  
TTTGTGCATCTGTGTATATAGGGGAATATAAATAACTCAAATATAGTAATTGAAATGTTGTAACAACACAA  
AGGGGAATAATTATTTTCGACATACTATGACGAATGATGCTGATGGCGAATTATTAATACACCCTTCTCTGC  
TGATCATAACACACATGATATACTAATGAAAGTATCCAATTTAACCTTTATGGAGAAGATAGTAATCCAA  
CTAAACTAATAAATAAATATAATTATACAGAATGCTGATTATAAAAAAAGTGTGATGATAGTAGAAAAAC  
AAAAATATAAGTGTGAAGCTACGCATATTGTGATTAATTAGACAACAGCAATTTTCGAAAATAGCTAATA  
TCATCGTTGTTCTCAACATGTTGCTGCTAAATAACCAAGCGAAGTATAAAACCACCAAGATTGTATGA  
ACATTATTCTTCACATTGCAGATGGGTGGAACATCAAAAAAATGTATATTATACGCAACCTCCACAATA  
ATGGTGTGGAATCACCGCACTAAAAAATATGGACATATTGAAAAACGACTGGGAGACAGACGACAC  
AACATGAGGGGAGTACCCCTCAATAAGAGATATCACTAGAAACA

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J20\_03

AGGGAGAAGGCCGATACTCGATCATGTGCCTGGCACCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGGAC  
TTGGGCGAAATGCACATATCTCGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAAAGCAATGC

TTTTGGGATTCAAGTCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGGTTTTCTTT  
TCCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTCGAAAATAAAAGTTT  
TTGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTGATA  
CAATATGTACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCTGCATAGCA  
GTTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAAAGTAAATGGAATCGTAGA  
TCATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTCCTTCT  
TTGTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCCATATTGAA  
ACTATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAAAGAAAGGA  
TATACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACAACAAATAAATGTTGCGCGGAGACAACAGAA  
AATTTCCAATATATATACATTATAAAATATATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTTATTTAAAAAATAAAA  
AAATTTCTTATTATTAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTTGGATAGAATCCCAGGCCCGCAATGTGC  
GTTCAAAGTGTCGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGAAGACGCGGATTGTGTCTCATCGACTC  
AG

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J21\_07

TGTAGCCCGAAATAGGATCGCATCTTAGGCCTGGCACCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGGA  
CTTGGGCGAAATGCACATATCTCGGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAAAGCAATG  
CTTTTGGGATTCAAGTCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGGTTTTCTT  
TTCCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTCGAAAATACAAGTT  
TTTGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTGAT  
ACAATATGTACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCTGCATAGC  
AGTTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAAAGTAAATGGAATCGTAG  
ATCATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTCCTTCT  
TTTGTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCCATATTGAA  
ACTATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAAAGAAAGGA  
TATACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACAACAAATAAATGTTGCGCGGAGACAACAGAAAA  
TTTCCAATATATATACATTATAAAATGTATATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTTATTTAAAAAATAAAA  
AATTTCTTATTATTAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTTGGATAGAATCCCAGGCCCGCAATGTGC  
TTCAAAGTGTCGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGACGACGCGGATTGCTCGTCTTCTGACCGA  
C

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J22\_02

ATGCGAGCACCGAAATAGGCTCTGCATCTACGGGCCTGGCACCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAA  
GATGGACTTGGGCGAAATGCACATATCTCGGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAA  
AGCAATGCTTTTGGGATTCAAGTCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTT  
GGTTTCTTTTCCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTCGAAAA  
TACAAGTTTTTGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACA  
GTTGTGATAAATATGTACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCT  
GCATAGCAGTTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAAAGTAAATGGA  
ATCGTAGATCATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTC  
CCCCTTCTTTGTTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCC  
ATATTGAAACTATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAA  
GAAAGGATATACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACAACAAATAAATGTTGCGCGGAGACAA  
CAGAAAAATTTCCAATATATATACATTATAAAATGTATATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTTATTTAAAA  
ATAAAAAATTTCTTATTATTAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTTGGATAGAATCCCAGGCCCGCA  
ATGTGCGTTCAAAGTGTCGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGAAGACGCGCGGTTGCTGCGTCTC  
TGACACACAG

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J23

GATGCGTGAGAGAGCGCAACTCGGCGTCGTATGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACACTTTGA  
ACGCACATTGCGGCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCTGTTAATAATAAGAAAT  
TTTTTATTTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATACATTTTATAATGTATATATATTGAAAT

TTTCTGTTGTCTCGCGCAACATTTATTTGTTGTGTGTGCAACAGTATTTCTAAATACACTTGTGTATATCCT  
TTCTTTTGGCTAATAGTATTTCTCTGATATACTTGGTTTTTTTTTCTCTTTTTAAAGCGCATAGTTTCAATAT  
GGAAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTAAATGTTTAAACAAAGAAGG  
GGAATTTTTTTCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGATCTACGAT  
TCCATTTACTTTTGAGAGTTTAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGTATTTTTAAACTGCTCTGCAG  
AAAAAAAAATATAGTGAAGTAGATATGTAATAATTACTCAGATTTTCAAATAGTACATATTGTATCACAAC  
TGTGTAATAAATAAAGGATATAAACCAGTTTTTGAGAAATATTTCAATTGAATGGCAACACAAAACTTG  
TATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTCCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGGAAAAGAA  
ACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCAAAAGCAT  
TGCTTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTGCCCCAAGTC  
CATCTGAACGAGGCCACGGTCCCGAGAGGGTGCCAGCCCAAGATGCGATCCTATTCCGGTGCTCACAT  
>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J25\_01

ACGTGGGTAGAAGACGCGCAATCGCGCGTCTGTCATGTGAACTGCAGGACACATGAACATCGACTT  
TGAACGCACATTGCGGCCCTGGGATTCTATCCAAGGGCCACGCCTGTCTGAGGGTCGTTAATAATAAGA  
AATTTTTTATTTTTTAAATAAAAAATTTCTTTAAATTTTATATATATATATTTATAATGTATATATATATTGGA  
AATTTTCTGTTGTCTCGCGCGCAACATATATGTGGTGTGTGTGCAACAGTATTTCTAAATACACTTGTGTA  
TATCCTTTCTTGGGGCTAATAGTATTTCTCTGATATACTTGGTTTTTTTTTCTCTTTTTAAAGCGCATAGTTT  
CAATATGGAAATTTGTTATCTGGTATATTGGTAATAAAATTCTCAAGTATAGTAGTAAATGTTTAAACAA  
GAAGGGGAATTTTTTTCGCATCTAGGCAATGTCTGGGCGATTTTTCCCTTCTGTATAAAACAATGATC  
TACGATTCCATTTACTTTTGAGAGTTTAACCAATTCCTATTATTATATATATCAGCTGTATTTTTAAACTGCT  
ATGCAGAAAAAAAATATAGTGAAGTAGATATGTAATAATTACTCAGATTTTCAAATAGTACATATTGTAT  
CACAACGTGTAATAAATAAAGGATATAAACCAGTTTTTGAGAAATATTTCAATTGAATGGCAACACAAA  
AACTTGTATTTTCGACCTCAGATTAGGTGGGATTCCCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTAAGCGGTGGAA  
AAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAGCTGCGAGTGAACAGGGATTAGCCCAGCACTGAATCCCAAA  
AGCATTGCTTTTAGGGAAATGTAGTGTGGGAGGGCTCAATTAACCCCGAGATATGTGCATTTGCCCC  
AAGTCCATCTTGAACGAGGCCACGGTCCCGAGAGGGTGCCAGGCCAATGATGCGAGCTATTCCGGTCTT  
CCA

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J25\_02

TGCGACAGACCGAAATAGCATTTCGCATCATTGGGCTGGCACCCCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAG  
ATGGACTTGGGCGAAATGCACATATCTCGGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACTACATTTCCCTAAAA  
GCAATGCTTTTGGGATTCAAGTGTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTG  
GTTTCTTTCCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTCGAAAAT  
ACAAGTTTTTGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAG  
TTGTGATACAATATGACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACTATATTTTTTTTTCTG  
CATAGCAGTTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAAGTAAATGGAA  
TCGTAGATCATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTC  
CCCTTCTTTGTTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCCAT  
ATTGAAACTATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAAAG  
AAAGGATATACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACAACAAATAAATGTTGCGCGCGAGACA  
ACAGAAAATTTCCAATATATATATACATTATAAAATATATATATAAAAATTTAAAGAAATTTTTTATTTAAAA  
AATAAAAAATTTCTTATTATAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTTGATAGAATCCCAGGGCCGC  
AATGTGCGTTCAAAGTGTGATGTTTCATGTGTCTGCAGTTCACATGACGACGCGCGGTTGCTGCTCTT  
CTGCACCACCAGG

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J25\_03

ATGGACCGAAATAGATCGCATCTTAGGCCTGGCACCCCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGGACT  
TGGGCGAAATGCACATATCTCGGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACTACATTTCCCTAAAAGCAATGCT  
TTTGGGATTCAAGTGTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGGTTTTTTTT  
CCACCGCTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTCGAAAATACAAGTTTT  
TGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTGATAC

AATATG TACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCTGCAGAGCAG  
TTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAGTAAATGGAATCGTAGAT  
CATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTCCCCTTCTTT  
GTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTATTACCAATATACCAGATCACAAATTTCCATATTGAAAC  
TATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAAAGAAAGGATA  
TACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACAACAAATAAATGTTGCGCGAGACAACAGAAAATT  
TCCAATATATATACATTATAAAATGTATATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTTATTTAAAAAATAAAAAA  
TTTTCTATTATTAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTTGGATAGAATCCCAGGCCCGCAATGTGCGTT  
CAAAGTGTGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGACAGACGCGCAGTTGCTGCTCTTCTGACCTAC  
GTCGGCGA

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J31\_01

TCGTGGAGCCCGAAATAGGATCCGCATTTTAGGGCCTGGCACCCCTCTCGGGACCGTGGCCTCGTTCAA  
GATGGACTTGGGCGAAATGCACATATCTCGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAA  
AGCAATGCTTTTGGGATTCAGTGCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTT  
GGTTTCTTTTCCACCGTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTGCAAAA  
TAAAAGTTTTTGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACA  
GTTGTGATACAATATG TACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCT  
GCATAGCAGTTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAGTAAATGGA  
ATCGTAGATCATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATT  
CCCCTTCTTTGTTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCC  
ATATTGAAACTATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAA  
GAAAGGATATACACAAGTGTATTTAGAAATACTGTTGCACACACAACAAATAAATGTTGCGCGGAGAC  
AACAGAAAATTTCCAATATATATACATTATAAAATATATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTTATTTAA  
AAATAAAAAAATTTCTTATTATTAACGACCCTCAGACAGGCGTGGCCCTTGGATAGAATCCCAGGGCCG  
CAATGTGCGTTCAAAGTGTGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATACACGCGCGGTGTGCTCTCTGC  
ACTCG

>assembly/edit\_dir/assembly.fasta.Contig1\_J33\_01

GGCACCGAAATAGATCGCATCACGGCCTGGCACCCCTCTCGGTGACCGTGGCCTCGTTCAAGATGGAC  
TTGGGCGAAATGCACATATCTCGGGTTAATTGAGCCCTCCCAAACACTACATTTCCCTAAAAGCAATGC  
TTTTGGGATTCAGTGCTGGGCTAATCCCTGTTCACTCGCAGCTACTAAGGGAATCCCTGTTGGTTTCTTT  
TCCACCGTTACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGGAATCCCACCTAATCTGAGGTGCAAAATACAAGTTT  
TTGTGTTGCCATTCAATTGAAATATTTCTCAAAAAGTGGTTTATATCCTTTTTATTTTACACAGTTGTGATA  
CAATATG TACTATTTGAAAATCTGAGTAATTATTACATATCTACTTACACTATATTTTTTTTTCTGCATAGCA  
GTTTAAAAATACAGCTGATATATATAATAATAGGAATTGGTTAAACTCTCAAAGTAAATGGAATCGTAGA  
TCATTGTTTTATACAGGAAGGGAAAAAATCGCCCAGACATTGCCTAGATGCGAAAAAATTCCCCTTCT  
TTGTTAAACATTTCACTACTATACTTGAGAATTTATTACCAATATACCAGATAACAAATTTCCATATTGAA  
ACTATGCGCTTTAAAAAGAGAAAAAAAACCAAGTATATCAGAGAAATACTATTAGCCAAGAGAGGA  
GGATATACACAAGTGTATTTAGATATACTGTTGCACACACCACATATATATGGTGC GCGAGACAACAGAA  
AATTTCCAATATATATACATTATAAAATATATATATAAAATTTAAAGAAATTTTTTATGTTCAAAAATAA  
AAAAATTTCTTACTTACTTAACGACCCTCAGACAGCGGTGGCCCTTGGATAGAATGCCAGGGCCGCA  
ATGTGCGTTCAAAGTGTGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGACGACGCGGAGTTGCTGCTCTC  
TCCAACGCAG