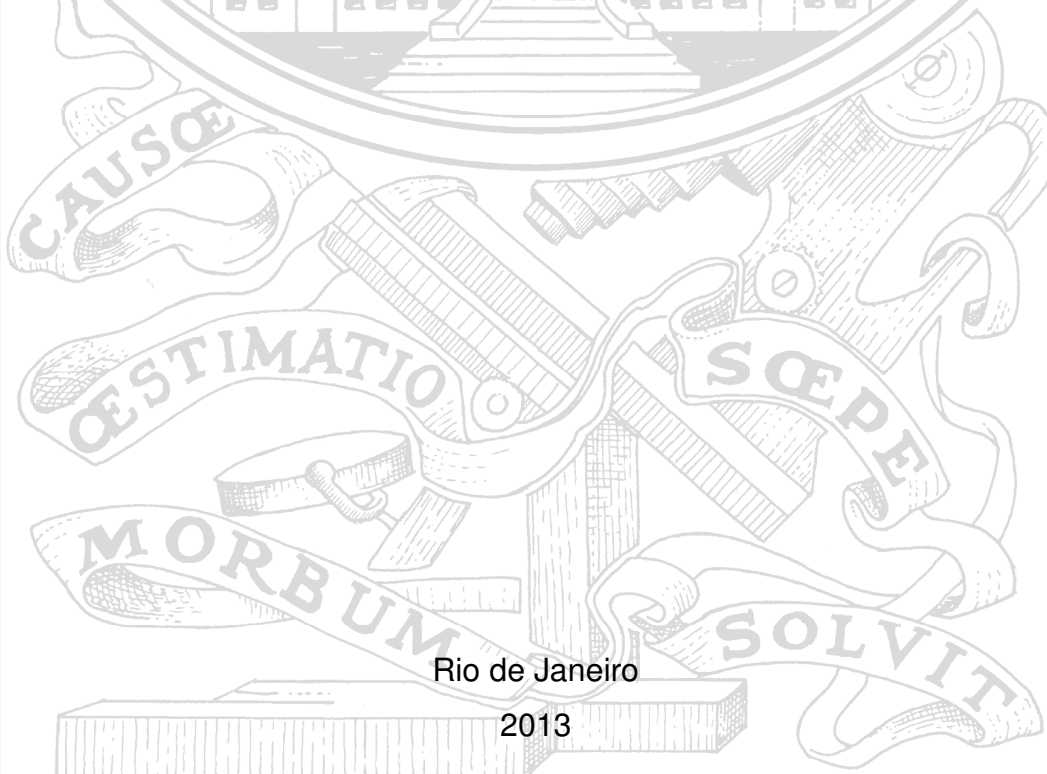


MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

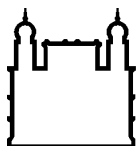
**Análise espacial como ferramenta para definição de áreas
de risco de emergência de surtos de doença de Chagas
aguda no Estado do Pará**

Samanta Cristina das Chagas Xavier



Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Análise espacial como ferramenta para definição de áreas
de risco de emergência de surtos de doença de Chagas
aguda no Estado do Pará**

Samanta Cristina das Chagas Xavier

Orientadora: Dr^a. Ana Maria Jansen

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

RIO DE JANEIRO

Março, 2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

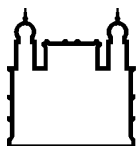
X3 Xavier, Samanta Cristina das Chagas

Análise espacial como ferramenta para definição de áreas de risco de emergência de surtos de doença de Chagas aguda no estado do Pará / Samanta Cristina das Chagas Xavier. – Rio de Janeiro, 2013.
xii,140 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.
Bibliografia: f. 88-107

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Ciclos de transmissão. 3. Análise espacial. 4. Lógica Fuzzy. 5. Doença de Chagas aguda (DCA). 6. Transmissão oral. 7. Amazônia. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Análise espacial como ferramenta para definição de áreas
de risco de emergência de surtos de doença de Chagas
aguda no Estado do Pará**

Samanta Cristina das Chagas Xavier

ORIENTADORA: Dr^a. Ana Maria Jansen

Aprovada em: 05/03/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas (IOC/FIOCRUZ) - Presidente

Prof. Dr. José Bento Pereira Lima - (IOC/FIOCRUZ) - Membro

Prof. Dr. Luiz Felipe Coutinho Ferreira da Silva (D.E do IME) - Membro

Prof. Dr. Luiz Fernando Ferreira (ENSP/FIOCRUZ) - Suplente

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (UFF) – Suplente

***A minha querida Avó Elina Xavier
Que me proporcionou uma
Infância maravilhosa com
Muito amor e carinho
Te amo***

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança"

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

A Deus que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminhar e pelas oportunidades que me foram dadas na vida.

Ao meu marido e meus filhos, pelo carinho, compreensão nos momentos de minha ausência e incentivo durante a realização deste trabalho.

A minha querida mãe, meus pais, meu irmão, pelo incentivo, compreensão e carinho em todos os momentos.

A Dr^a. Ana Maria Jansen a melhor orientadora que eu poderia desejar, que sempre me estimulou a seguir em frente e não desistir, principalmente pela sua grande capacidade como pesquisadora, orientadora e pessoa! Sou inteiramente grata por essa pessoa maravilhosa que Deus e minha querida prima Branca (Valdirene), colocou no meu caminho! Muito Obrigada!!!

Ao meu professor Luiz Felipe Coutinho Ferreira da Silva, pelo carinho, orientação, ensinamentos e apoio em todas as situações. Ainda tenho muito que aprender e espero contar com sua parceria profissional por longos anos.

À Dra. Vera Bongertz, com quem sempre podemos contar para revisão e discussão de nossos trabalhos. Obrigado pelas sugestões que certamente engrandecem os trabalhos.

Ao André Roque, pela valiosa parceria nos artigos e por estar sempre pronto a auxiliar em qualquer momento que preciso.

Ao professor Marcello Goulart Teixeira do Departamento de Ciências da Computação da UFRJ, pela colaboração no desenvolvimento e análise da modelagem do sistema fuzzy. Profissional competente e pessoa agradabilíssima que tive oportunidade de conhecer durante essa tese.

As amigas Valquíria e Lipo, pela amizade verdadeira e apoio fraternal em todos os momentos.

A minha querida madrinha Néia que me recebeu com carinho de vovó quando comecei no laboratório como aluna de iniciação científica.

Em especial aos amigos Marcos, Carlos, pelo apoio na parte técnica.

Toda equipe da sorologia do LabTrip em especial Kerla e Alessandra (tonhão) pelo apoio e dedicação.

Aos alunos de PIBIC Thales e Allison, pelo auxílio com dedicação e responsabilidade em diferentes momentos dessa tese.

Especialmente a amiga Bia, que me acompanhou durante os 4 anos de doutorado sempre presente em todos os momentos.

À Família LabTrip (Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos) e a todos outros que passaram pelo Labtrip, que foram fundamentais para a conclusão desse ciclo. Sem vocês essa trajetória não seria tão prazerosa!!!

A todo o PESSOAL DE CAMPO do Ministério da Saúde e das Secretarias Municipais e Estaduais, com quem tive a oportunidade de trabalhar.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED- Biomamguinhos, FIOCRUZ – RJ) em especial ao Edmilson, Eliana, Michel, Adenal, lamara e Lúcia que me receberam e me auxiliaram na padronização dos experimentos colaborando com a doação dos reagentes. Obrigado pela paciência e agradável convívio.

A Fundação Oswaldo Cruz, pela possibilidade de desenvolvimento profissional.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Instituto Militar de Engenharia (IME), departamento de Engenharia Cartográfica, pela oportunidade do aprendizado e apoio no desenvolvimento desta tese.

Ao suporte financeiro deste projeto: IOC/FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq e CAPES.

Às diversas outras pessoas que, mesmo no anonimato, contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Minha eterna gratidão!

Introdução	1
O parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
<i>Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi</i>	1
<i>Diversidade populacional de Trypanosoma cruzi</i>	3
<i>Os ciclos de transmissão de Trypanosoma cruzi</i>	6
Epidemiologia da doença de Chagas	7
Estudo Epidemiológico do atual perfil de doença de Chagas Aguda - DCA.....	9
Histórico da doença de Chagas na Amazônia.....	11
Cenário da doença de Chagas no Pará.....	15
Reservatórios.....	18
Cães como hospedeiros sentinela.....	21
Uma abordagem geoespacial na definição de área de risco de DCA.....	23
<i>Interpolação</i>	25
<i>Álgebra de Mapas</i>	26
<i>Método Fuzzy como nova ferramenta no diagnóstico ambiental dos fatores de risco de DCA</i>	27
Funções de Pertinência	31
Funções de pertinência triangulares.....	32
Funções de pertinência trapezoidal	33
Funções de pertinência Gaussianas	34
Operações com Conjuntos Fuzzy.....	34
Variáveis Lingüísticas	36
Regras Fuzzy	38
Sistemas de Inferência Fuzzy.....	39
Defuzzificação	40
Objetivo Geral	42
Objetivos específicos.....	42
Resultados	43
Artigo 1. The ecology of the <i>Trypanosoma cruzi</i> transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes	44

Artigo 2. <i>Trypanosoma cruzi</i> among wild mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil): risk of transmission to domestic mammals and humans.....	51
Artigo 3. Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk.....	59
Discussão Geral	74
Conclusões.....	86
Referências bibliográficas.....	87
Anexo 1. Modelo fuzzy de inferência espacial na determinação de áreas de maior risco de DCA	107
Anexo 2.	121
Genotype variation of <i>Trypanosoma cruzi</i> isolates from different Brazilian biomes.....	121
Anexo 3.	127
<i>Trypanosoma cruzi</i> TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil.....	127

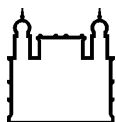
FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> e estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. Teixeira et al. (2012).	2
Figura 2. (A) Casos confirmados de DCA, segundo o ano de notificação e forma de transmissão no estado do Pará 2001 a 2011 (B) Casos confirmados de DCA por UF/região de infecção e forma de transmissão 2001 a 2011 (Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net (Dados de 2011 atualizados em 28/06/2012, dados parciais).....	14
Figura 3. Divisão municipal do Estado do Pará (Fonte: http://www.sepe.pa.gov.br/zee/Shapes.asp).....	15
Figura 4. Distribuição espaço-temporal dos casos confirmados de DCA segundo o município de infecção no estado do Pará de 2002 a 2011 (Fonte dos dados: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net).	17
Figura 5. Sazonalidade dos casos de DCA por transmissão vetorial oral no estado do Pará, mapeados conforme os períodos de maior (A) e menor (B) índice pluviométrico.....	17
Figura 6. Diferença entre a Fronteira Fuzzy (A) e Booleana (B). Modificado de Burrough & McDonnell <i>apud</i> Ruhoff (2004).	30
Figura 7. Função de Pertinência Triangular.	33
Figura 8. Função de Pertinência Trapezoidal.....	33
Figura 9. Função de pertinência Gaussiana.....	34
Figura 10. (a) Diagrama dos conjuntos <i>A</i> e <i>B</i> (b) Diagrama do conjunto união $A \cup B$.	35
Figura 11. (a) Diagrama dos conjuntos <i>A</i> e <i>B</i> (b) Diagrama do conjunto intersecção $A \cap B$	35
Figura 12. (a) Diagrama do conjunto <i>A</i> (b) Diagrama do conjunto complementar de <i>A</i> (A^c).	36
Figura 13. Variável lingüística risco de transmissão de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Figura 14. Funções de pertinência associadas a variável lingüística risco de transmissão de <i>T. cruzi</i>	37
Figura 15. Estrutura geral dos sistemas de inferência Fuzzy	40

Figura 16. Método de defuzzificação médias dos máximos, Ortega, 2001 <i>apud</i> Anjos, 2008.	40
Figura 17. Método de defuzzificação Centro de Área, Ortega, 2001 <i>apud</i> Anjos, 2008.	41
Figura 18. Método de defuzzificação método das alturas, Ortega, 2001 <i>apud</i> Anjos, 2008.	41
Figura 19. Fluxograma geral da estrutura hierárquica fuzzy para a avaliação do risco de transmissão de DCA	107
Figura 20. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador doença de Chagas	108
Figura 21. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador entomológico.....	109
Figura 22. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador mamíferos.....	110
Figura 23. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador ambiental	111
Figura 24. Mapeamento da Inferência espacial Fuzzy do risco de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> : áreas com pertinência de risco de transmissão de <i>T. cruzi</i> obtidas segundo inferência fuzzy. (A) município de Belém - Pará: (1) - Ilha do papagaio; (2) - ilha do Cumbú; (3) - Ilha do Murutucum; (4) - Jurunas; (5) - Val de Cans. (B) município de Abaetetuba - Pará: (6) - Panacaeira; (7) - Ajuai; (8) - Genipaúba; (9) - área urbana.....	112

TABELAS

Tabela 1. Classificação dos genótipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> , segundo a nomenclatura de 2009	5
Tabela 2. Variáveis da árvore hierárquica de decisão fuzzy para o mapa de risco de transmissão de DCA.	113



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

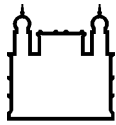
Análise espacial como ferramenta para definição de áreas de risco de emergência de surtos de doença de Chagas aguda no Estado do Pará

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Samanta Cristina das Chagas Xavier

Atualmente, os casos de doença de Chagas aguda (DCA) vêm sendo devidos à ingestão de alimento contaminado por formas infectivas do vetor, as formas metacíclicas, e/ou devido à invasão de domicílios por triatomíneos silvestres infectados atraídos pela luz. O novo perfil epidemiológico que a doença de Chagas vem adquirindo, exige um novo olhar e o delineamento de novas ferramentas na definição de medidas de vigilância e controle. O caráter recorrente dos surtos de DCA demonstra que ainda não se encontrou medidas de controle efetivas dentro deste novo perfil epidemiológico. *Trypanosoma cruzi* é um táxon extremamente heterogêneo, inclui 6 genótipos que infectam centenas de espécies de mamíferos e vetores em ciclos de transmissão complexos com características e particularidades locais e temporais. Nosso objetivo foi avaliar a aplicação da análise geoespacial por Lógica Fuzzy, como ferramenta a ser utilizada para reconhecer áreas de risco e fornecer elementos para definição de ações sustentáveis de vigilância epidemiológica na região Amazônica. Para tanto, inicialmente geramos dados referentes à distribuição das DTUs TcIII e TcIV, descritas como típicas da Amazônia, nos biomas brasileiros. Observamos que estas DTUs não estão restritas à Amazônia e sim estão amplamente dispersas na natureza tendo sido encontradas infectando seis ordens de mamíferos e distribuídas por cinco biomas. Em seguida geramos dados sobre as variáveis envolvidas no ciclo enzootico de *T. cruzi* em três localidades de Abaetetuba/Pará, onde são registrados casos recorrentes de DCA. Este estudo mostrou distintos perfis enzooticos em cada localidade sendo a infecção de cães por *T. cruzi* a única característica comum às áreas e sinalizadora da existência de um ciclo silvestre de transmissão em áreas de atividade humana. Esses dados nos levaram a avaliar e validar o uso de cães como sentinela de áreas de risco e a sua detecção como medida de vigilância epidemiológica. Assim, concluímos como ponto de corte para definir uma área de risco epidemiológico e a implementação de programas de sensibilização e educação a soroprevalência de cães deve ser $\geq 30\%$. O conjunto destes resultados nos permitiu concluir que o ciclo enzootico de transmissão de *T. cruzi* é dinâmico, sazonal, multifatorial e modifica-se conforme as condições ambientais naturais e conseqüentemente com a utilização da paisagem pelo homem. Com o conjunto de variáveis gerados por nós e obtidos referentes as variáveis entomológicas, ambientais, meteorológicos (CEPETEC) e dados de casos de doença de Chagas (SINAN e SESP). Após iniciou-se a construção de mapas protótipos de áreas de risco como forma de consolidar critérios de definição de áreas estratégicas de ação e assim prevenir novos casos de DCA. Foi testada a abordagem geoespacial por interpolação e álgebra de mapas como uma ferramenta do diagnóstico ambiental das variáveis reguladoras da transmissão de *T. cruzi* na natureza. O conjunto das variáveis primárias e secundárias foi tratado pelo método fuzzy de inferência espacial na construção de um modelo de integração. O modelo demonstrou a possibilidade de usar essa nova abordagem na identificação de áreas com diferentes graus de risco, permitindo uma representação contínua e integrada das variáveis envolvidas na transmissão de *T. cruzi* na natureza.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Spatial analysis as a tool for defining risk areas for emergence of acute Chagas' disease outbreaks in Para State, Brazil

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Samanta Cristina das Chagas Xavier

Currently, cases of Acute Chagas Disease (ACD) have occurred due to the ingestion of food contaminated with infective forms of the vector, metacyclic forms, and or due to the household invasion by infected triatomines attracted by artificial light. This new Chagas disease epidemiological profile, requires a new look and the design of new tools for the definition of surveillance and control strategies. The character recurrent ACD outbreaks demonstrate that we still haven't found effective control measures for this new epidemiological profile. *Trypanosoma cruzi* is an extremely heterogeneous taxon that includes 6 genotypes, which infect hundreds of mammals and vectors species within complex transmission cycles with local and temporal peculiarities.. Our objective was to evaluate the application of geospatial analysis by Fuzzy Logic as a tool to be used to recognize risk areas and provide elements for defining sustainable epidemiological surveillance in the Amazon region. Therefore, we initially generated data regarding the distribution of DTUs TcIII and TcIV, described as typical of the Amazon, throughout other Brazilian biomes. We observed that these DTUs are not restricted to the Amazon but they are widely dispersed in nature as they were found infecting six mammalian orders and were distributed in five biomes. Then, we generated data on the variables involved in the *T. cruzi* enzootic cycles in three different localities of the municipality of Abaetetuba, Pará State, where recurrent cases of ACD are registered. This study revealed distinct enzootic profiles in each location. Dogs' infection by *T. cruzi* was the only common feature among those areas, thus they signaling the existence of a sylvatic transmission cycle in areas of human activity. These results led us to evaluate and validate the use of dogs as sentinel of risk areas and its use as a surveillance tool. We defined that dogs' seroprevalence of $\geq 30\%$ is the cut off to define an area of epidemiological risk and thus candidate to the implementation of surveillance and education programs. Altogether, these results allowed us to conclude that the *T. cruzi* enzootic transmission cycle is dynamic, seasonal, multifunctional and modifies itself according to the environmental conditions and, consequently, with the human landscape modification. Putting together the set of variables generated by us, the assembled entomological, environmental and meteorological (CEPETEC) variables, and the data on Chagas disease cases (SINAN and SESPA), we began to build prototypes of risk maps as an approach to consolidate criteria for the demarcation of strategic areas for the implementation of actions to prevent further ACD cases. We tested the geospatial interpolation and map algebra approach as a diagnostic tool of the environmental variables which regulate the *T. cruzi* transmission in nature. The set of primary and secondary variables were treated by the fuzzy method of spatial inference in order to build an integrated model. This model demonstrated the possibility to use this novel approach in order to identify areas with different degrees of risk, thus allowing a continuous and integrated representation of the variables involved in the *T. cruzi* transmission in nature.

Introdução

O parasito *Trypanosoma cruzi*

Protozoário parasita da família Trypanosomatidae e ordem Trypanosomatida (Moreira et al. 2004) descrito por Carlos Chagas em 1909, *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas que atinge atualmente cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina (Yeo et al. 2005; Schofield et al. 2006). Apresenta uma ampla distribuição na natureza, do sul dos Estados Unidos à Patagônia (Carrasco et al. 2012). A Tripanosomíase por *T. cruzi* caracteriza-se como uma complexa zoonose, transmitida por cerca de 130 espécies de triatomíneos vetores da família Reduviidae, subfamília Triatominae (insetos hemípteros que são exclusivamente hematófagos em todos os estágios de vida) e capaz de infectar mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e silvestres distribuídos em 8 ordens (Yeo et al. 2005; PAHO, 2009; Jiménez-Coello et al. 2012). Briones et al. (1999); Macedo et al. (2001), sugerem que a origem de *T. cruzi* como espécie é estimada entre 100 e 150 milhões de anos. Já Flores-López e Machado, (2011) mostram que as atuais linhagens existentes de *T. cruzi* divergiram muito recentemente, nos últimos 3 milhões de anos, e que o evento de hibridização principal que conduz aos híbridos TCV e TcVI ocorreu menos de 1 milhão de anos atrás. Independentemente da hipótese a infecção humana pode ser considerada um evento recente na história evolutiva de *T. cruzi*, mais uma espécie de hospedeiro a ser introduzida à rede epidemiológica complexa e já bem estabelecida e extensa na natureza (Guhl et al. 2000; Macedo et al. 2004). Portanto, a infecção por *T. cruzi* foi mantida há milhões de anos como uma exclusiva enzootia (Coura et al. 2010).

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com quatro estágios de desenvolvimento em insetos vetores e hospedeiros mamíferos (Rassi et al. 2010) (Figura 1). Das quatro formas evolutivas de *T. cruzi*, três (tripomastigota sanguícola, tripomastigota metacíclica e amastigota) são capazes de infectar e essa infecção se dá por diferentes vias (vetorial contaminativa ou oral, congênita, transfusional e

por transplante de órgão), mostrando quão efetivo são os mecanismos de dispersão desse parasito (Mortara et al. 2008; Fernandes et al. 2012).

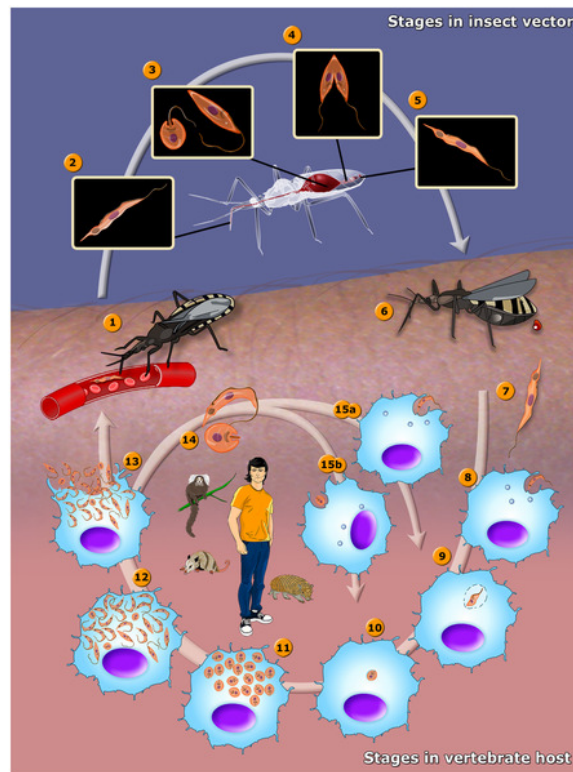


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* e estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. Teixeira et al. (2012).

A forma vetorial contaminativa, descrita como a forma clássica de transmissão de *T. cruzi* ao homem, ocorre quando o inseto vetor, ao realizar seu repasto sanguíneo, elimina formas tripomastigotas metacíclicas junto com as fezes. Esses parasitos penetram pelo local da picada ou mucosas quando a pessoa se coça ou esfrega o local da picada. No hospedeiro mamífero, esses parasitos invadem as células nucleadas de praticamente todos os tecidos, onde se diferenciam na forma multiplicativa, amastigota. A saída da célula, após nova diferenciação celular para a forma tripomastigota, se dá pelo rompimento celular que ocorre tanto na forma ativa (desencadeada pela multiplicação parasitária intra-celular) quanto passiva (desencadeada pela própria célula). A transmissão para o inseto vetor ocorre quando formas tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado são ingeridas por outro triatomíneo em um novo repasto sanguíneo. No hospedeiro invertebrado, os parasitos diferenciam-se para a forma epimastigota, que é a forma replicativa no trato digestivo do inseto vetor. Na porção final do intestino do inseto,

há nova diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica (metaciclogênese), que é a forma infectiva eliminada nas fezes do barbeiro, completando assim o ciclo do parasita (Brener 1971; Tyler e Engman 2003; Rassi et al. 2009; Teixeira et al. 2012).

Diversidade populacional de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é caracterizado por apresentar uma estrutura populacional multiclonal com elevado grau de variabilidade genética intra-específica. Esta variabilidade é resultante tanto da longa evolução clonal e antiguidade da enzootia envolvendo grande diversidade de hospedeiros e vetores quanto dos raros eventos de fluxo gênico já observados (Ocaña-Mayorga et al. 2010; Carrasco et al. 1996; Gaunt et al. 2003).

Um mesmo hospedeiro ou vetor pode abrigar simultaneamente diferentes subpopulações ou clones de *T. cruzi*. Esses clones podem competir entre si sendo que dadas subpopulações podem ser selecionadas em detrimento de outras em nichos, hospedeiros e áreas geográficas específicos (Macedo et al. 2004), cujas implicações para as formas clínicas da doença, como o desenvolvimento de cardiopatia, megaesôfago, e megacólon ainda não foram esclarecidas (Manoel-Caetano e Silva, 2007).

A heterogeneidade de *T. cruzi* que já havia sido notada por Chagas e Brumpt (formas largas e finas), vem sendo discutida até o presente. A partir daí, junto com aumento do poder resolutivo e gradativa disponibilidade de ferramentas metodológicas, seguiram-se intensos estudos para determinar marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares que esclarecessem a epidemiologia da doença de Chagas (Miles et al. 1980; Rassi et al. 2010).

Andrade (1974), com base em características morfológicas dos parasitos no sangue periférico de camundongos e comportamento dos isolados nestes hospedeiros, agrupou a população de *T. cruzi* em tipos ou biodemas I-III (Andrade 1974 *Apud* Andrade et al. 1983).

Uma das primeiras técnicas para avaliar a heterogeneidade bioquímica do parasita, foi a análise do polimorfismo eletroforético de enzimas isofuncionais (isoenzimas) que definiram três distintos grupos de *T. cruzi*, Zimodema 1 (Z1),

Zimodema 2 (Z2) e Zimodema 3 (Z3). Além disso, os autores encontraram correlação entre essa subdivisão e aspectos epidemiológicos, ou seja, Z1 foi associado ao ciclo silvestre, Z2 foi associado ao ciclo doméstico e Z3, embora mais raro, também associado ao ciclo silvestre em áreas restritas (Miles et al.1980).

Posteriormente, outros estudos ampliando o número de enzimas analisadas verificaram uma maior diversidade entre os isolados, encontrando 44 Zimodemas diferentes (Tibayrenc et al. 1988). Concomitantemente, um alto grau de diversidade de *T. cruzi* foi observado, quando seu DNA mitocondrial (k-DNA) foi analisado por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Morel et al. 1980).

Em contraste com a alta diversidade encontrada nos estudos com marcadores multilocus, a amplificação por PCR (reação de polimerização em cadeia) de marcadores genéticos específicos como o gene de rRNA 24S α e da Região Intergênica do Gene de Mini-exon, indicaram um claro dimorfismo entre os isolados de *T. cruzi* (Souto et al. 1996; Fernandes et al. 1999). Uma vez que estes genótipos corresponderam respectivamente aos Zimodemas 1 e 2 de Miles e colaboradores (1980), uma unificação na nomenclatura foi proposta e os dois genótipos denominados TcI e TcII (Anonymous, 1999). O posicionamento do Zimodema 3, inicialmente indefinido, se encontraria mais tarde na linhagem TcII, após a subdivisão de TcII em TcIIa - TcIIe (Freitas et al. 2006). A subdivisão corroborada por estudos utilizando outros marcadores genéticos e bioquímicos como tipagem por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) o que resultou na subdivisão de isolados de *T. cruzi* em 6 DTUs, denominados TcI e TcIIa-TcIIe (Brisse et al. 2000, Zingales et al. 2012).

Um consenso realizado em 2009 modificou a nomenclatura dos genótipos de *T. cruzi*, em seis Unidades Discretas de Tipagem (DTUs), conforme tabela 1 (Zingales et al. 2009, 2012).

Tabela 1. Classificação dos genótipos de *Trypanosoma cruzi*, segundo a nomenclatura de 2009

DTU	Abreviação	Nomenclatura anterior
T. cruzi I	TcI	DTU I
T. cruzi II	TcII	DTU IIb
T. cruzi III	TcIII	DTU IIc
T. cruzi IV	TcIV	DTU IIa
T. cruzi V	TcV	DTU II d
T. cruzi VI	TcVI	DTU II e

Adaptado de Zingales et al. (2009).

As DTUs mais dispersas e frequentes são TcI e TcII, e também onde a maior divergência molecular é observada. Os genótipos TcIII e TcIV têm distintos perfis polimórficos, mas algumas afinidades com outros genótipos, que ainda não são bem entendidas. Os genótipos TcV e TcVI apresentam evidências de serem resultantes de eventos de hibridação genômica com os genótipos TcII e TcIII (Brisse et al. 2000; Freitas et al. 2006; Lewis et al. 2009).

Todos esses genótipos ocorrem no Brasil, embora apresentem diferentes padrões eco-epidemiológicos e de distribuição geográfica (Zingales et al. 2012). A DTU TcI é o genótipo mais disperso e frequente na natureza e é o principal agente da doença de Chagas no norte da bacia Amazônica. Os surtos de doença de Chagas na Amazônia, cada vez mais frequentes, são causadas majoritariamente por este genótipo (Valente et al. 2009). Do mesmo modo, é proposto que a DTU TcII predomina abaixo da Bacia Amazônica e foi responsável pela grande maioria dos casos humanos nas antigas áreas endêmicas do país (Zingales et al. 2012). Este genótipo é o segundo mais frequente na natureza, porém de forma mais focal (Fernandes et al. 1998; Jansen et al. 1999; Miles et al. 2003; Rassi et al. 2010; Zingales et al. 2012).

Da distribuição das DTUs TcIII e TcIV (anteriormente Z3) no Brasil pouco se conhece e são descritos como sendo restrito a bacia Amazônica e quase exclusivamente associados a hospedeiros silvestres, ocorrendo em ciclos de transmissão mais restritos e extremamente focais, embora também já tenham sido associados a surtos orais na Amazônia brasileira (Monteiro et al. 2012). *T. cruzi* III/Z3, descrito classicamente como predominante de áreas silvestres e raramente

associado a doença de Chagas Aguda na Amazônia Brasileira, o primeiro surto de doença de Chagas aguda causado exclusivamente pelo genótipo TcIII/Z3, foi observado em uma área rural de Santa Maria no município de Coari/AM em 2007 (Monteiro et al. 2010). DTU TcIV é o genótipo responsável pelas infecções humanas na Amazônia Ocidental Brasileira, que ocorrem em surtos como infecções simples ou mistas com genótipo TcI (Monteiro et al. 2012). Surto de doença de Chagas causado infecção mista pelos genótipos TcI e Z3 (TcIII ou TIV) também foi descrito por Valente et al. (2009) em Mazagão, Amapá em 1996. Em áreas de surtos registrados na Amazônia Brasileira, 50% dos triatomíneos coletados nas proximidades das casas e aldeias estavam infectados por Z3 e TcI (Valente et al. 2009)

Do mesmo modo, é proposto que os genótipos híbridos TcV e TcVI circulem predominantemente no sul do Brasil e são mais associados ao ciclo doméstico. Seus hospedeiros silvestres são pouco conhecidos (Zingales et al. 2012). No entanto, recentemente, um isolado proveniente de *Trichomys laurentius* do Piauí, no bioma Caatinga, foi genotipado como TcV (Araújo et al. 2010).

Os ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi*

Classicamente foram descritos três ciclos de transmissão de *T. cruzi*, o denominado ciclo silvestre ou enzoótico, relacionado aos triatomíneos vetores e mamíferos silvestres e esporadicamente com a ocorrência de casos humanos: ciclo doméstico que envolve triatomíneos que colonizam o peridomicílio e/ou o domicílio, humanos e animais domésticos e/ou domiciliados; e o peridoméstico envolvendo mamíferos sinantrópicos, roedores, morcegos e marsupiais, principalmente (Freitas et al. 2006; Rassi et al. 2010). No entanto a expressiva plasticidade biológica de *T. cruzi* resulta em ciclos de transmissão na natureza que se caracterizam por serem multivariáveis, complexos e peculiares em escalas tempo-espacial, com distintos perfis epidemiológicos de transmissão. Na natureza, a transmissão de *T. cruzi* também ocorre em ciclos independentes ou sobrepostos, em um mesmo estrato florestal dependendo da ecologia dos hospedeiros, contribuindo para formar modalidades distintas de focos naturais de transmissão.

Além da clássica via vetorial de transmissão de *T. cruzi* ao homem, infecções humanas ocorrem também por: transfusão sanguínea, transplante de órgãos e via congênita. Embora, atualmente essas formas de transmissão sejam mais importantes em áreas não endêmicas, como EUA e Europa, atribuído à migração não controlada de áreas endêmicas da América Latina (Rassi et al. 2010).

Uma via de transmissão considerada importante no ambiente silvestre e que tem sido responsável pela maior parte das infecções humanas nos últimos anos é a via oral (Dias, 2006). Na natureza a via oral é provavelmente a mais antiga e eficiente via de dispersão de *T. cruzi* e parece ter um destaque maior devido à predação na cadeia trófica e a presença de três diferentes formas do parasito que são infectivas aos mamíferos (Mortara et al. 2008; Herrera et al. 2011).

Epidemiologia da doença de Chagas

O nome da doença é uma homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Carlos Chagas, que em 1909 identificou *T. cruzi*, a manifestação clínica da doença, sua anatomia patológica, epidemiologia e ciclo de transmissão (hospedeiros e vetores) (Rassi et al. 2010). Logo nos anos seguintes a descoberta se conheceu a magnitude da expansão do parasita na natureza, sendo conhecida a abundância de espécies de mamíferos e triatomíneos vetores envolvidos no ciclo do parasita (Macedo et al. 2004; Valente et al. 2009; Coura e Junqueira, 2012). A doença de Chagas foi descrita como uma doença de população pobre e de áreas rurais, onde eram encontrados os insetos vetores nas moradias de adobe (Dias, 2007; Coura e Viñas, 2010).

Atualmente, vem sendo proposto que a variabilidade de manifestações clínicas da doença de Chagas e diferenças geográficas na mortalidade e morbidade podem ser uma resultante da interação entre o pool genético do hospedeiro, resposta imune, o ambiente e principalmente pela composição das subpopulações do parasita no momento do inóculo (Manoel-Caetano e Silva, 2007).

A doença de Chagas ainda é uma importante infecção parasitária na América Latina (México à Patagônia), 25% de toda população da América Latina foi estimada sobre risco de infecção nos anos 1980 e 17,4 milhões estavam infectada em 18 países endêmicos entre 1980-1985. Já em 2005, a Organização Pan-Americana de

Saúde (OPAS) estimou 20% da população da América Latina sobre risco de infecção (109 milhões de pessoas) e 7,7 milhões de pessoas estavam infectadas com *T. cruzi* nos países endêmicos das Américas. A doença é reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais negligenciadas do mundo (WHO 2002; López-Céspedes et al. 2012). Outros resultados importantes foram a redução da incidência de novos casos de doença de Chagas (700,000 por ano em 1990 versus 41,200 por ano em 2006), além disso o número de mortes por doença de Chagas 45.000-12.500 (Moncayo e Silveira, 2009).

Nas últimas décadas, programas de controle da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* e melhoria das habitações foram voltados para eliminação e controle da doença de Chagas, tais como: A Iniciativa do Cone Sul/Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (1991), Iniciativa Pacto Andino/Colômbia, Equador, Peru e Venezuela e Iniciativa da América Central/Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá (1997), junto com a triagem dos bancos de sangue reduziram substancialmente (70%) a incidência da infecção e diminuiu o número de doença de Chagas na América Latina (Moncayo, 2003; Rassi et al. 2010). Entretanto, a transmissão vetorial extradomiciliar, transmissão vetorial domiciliar ou peridomiciliar sem colonização do vetor e a contaminação de alimentos por triatomíneos infectados representam desafios para os quais as medidas de controle adotadas contra o *T. infestans* não são eficazes. No nordeste brasileiro, há espécies de triatomíneos silvestres que vêm se adaptando às moradias, atraídos pelas luzes das casas. Com este perfil destacam-se *Triatoma brasiliensis* e o *Triatoma pseudomaculata* (Borges-Pereira et al. 2002). Estas espécies são descritas como capazes de recolonizar o ambiente a partir do ambiente silvestre o que nunca aconteceu com o *T. infestans*, espécie exótica que foi introduzida no Brasil provavelmente após a colonização das Américas, responsável pela transmissão intradomiciliar (Bargues et al. 2006; Noireau et al. 2009).

Apesar de estar controlada a transmissão vetorial intradomiciliar por *T. infestans* em todo o país, casos da doença por via oral puderam ser vistos em algumas localidades nos últimos anos, como no Pará (associado ao consumo do açaí), em Santa Catarina (associado ao consumo de caldo de cana de açúcar), em Ceará (associado ao consumo de uma sopa) e na Bahia (associado ao consumo de caldo de cana de açúcar) (Roque et al. 2008; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012).

A emergência ou a re-emergência da doença de Chagas, atualmente acontecendo principalmente pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi* (Pinto et al. 2008; Valente et al. 2009; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012) caracteriza um novo perfil epidemiológico. O controle da transmissão de *T. cruzi*, no atual cenário, sinaliza que esta zoonose deve ser analisada sob uma nova perspectiva epidemiológica, sendo infrutífero tentar adaptar para a situação atual, medidas de controle utilizadas no passado.

Por sua complexa epidemiologia, a doença de Chagas deve ser avaliada através de um olhar abrangente, multidisciplinar e de um incremento de mudanças antrópicas aceleradas. Há de se considerar, particularmente, a migração descontrolada, invasão de ambientes naturais, destruição de habitats e perda de biodiversidade. Um dos pontos importantes para se conhecer a complexa cadeia de transmissão de *T. cruzi* e portanto implementar medidas efetivas de controle é a avaliação e identificação das potenciais espécies reservatórias nas áreas de transmissão. Esta avaliação deve envolver o conhecimento da diversidade de mamíferos da área em questão (potenciais reservatórios do parasito) e seu papel na rede de transmissão. Inclui-se nas variáveis que devem ser avaliadas nos estudos do ciclo de transmissão de *T. cruzi*, a ocorrência e a distribuição de seus principais genótipos.

Estudo Epidemiológico do atual perfil de doença de Chagas Aguda - DCA

Alterações ambientais, naturais ou não, resultam na alteração dos padrões de distribuição da biodiversidade local e, portanto, de seus parasitas. As numerosas consequências da perturbação em uma determinada rede parasitária de transmissão são complexas, na maioria das vezes imprevisíveis e incluem a perda ou ganho de novos hospedeiros, novas áreas endêmicas e/ou na emergência e reemergência de doenças parasitárias (Ashford, 1996; Daszak et al. 2000; Dobson e Foufopoulos, 2001; Williams et al. 2002). Estudos indicam que, em geral, algum grau de distúrbio antrópico está associado com a simplificação da fauna e seleção de espécies marsupiais que são importantes reservatórios de *T. cruzi* (Jansen et al. 1999; Xavier et al. 2007).

A complexidade e imprevisibilidade destes fenômenos é especialmente acentuada quando inclui parasitas multi-hospedeiros como *T. cruzi*, caracterizados por uma expressiva heterogeneidade genética e ecletismo biológico.

A perda de habitats, perda da biodiversidade e entrada do homem em ecótopos silvestres leva à extinção aqueles animais mais susceptíveis a alterações e restrição ambientais. Espécies mais generalistas em relação aos habitats e fontes alimentares passam a ocupar novos nichos, aumentando sua biomassa. Vale ressaltar que, nas áreas com simplificação de fauna, tendem a predominar algumas poucas espécies que podem passar a assumir expressiva importância nos ciclos de transmissão de parasitas caso apresentem um perfil de infecção que resultem numa alta chance transmissibilidade ao vetor. A esta simplificação de fauna e seleção de hospedeiros competentes é atribuído o termo “Efeito Amplificador”, numa relação oposta ao “Efeito Diluidor” proposto por Schmidt e Ostfeld, (2001) e desde então utilizado para descrever surtos epizooticos como Leishmaniose Tegumentar Americana (Chaves e Hernandez, 2004), Hantavíruses (Dobson et al. 2006; Keesing et al. 2010), Febre do West Nilo (Kilpatrick et al. 2006) e doença de Chagas (Vaz et al. 2007; Xavier et al. 2007; Roque et al. 2008).

A manutenção da biodiversidade tem sido apontada como um poderoso sistema tamponador, regulador da dispersão de parasitas (Keesing et al. 2006 e 2010). Foi demonstrado que em áreas de DCA, além do clássico quadro de infecção adquirida pelo homem ao se expor no ciclo de transmissão silvestre, o risco de transmissão do parasito pode estar relacionado a alterações do cenário paisagístico, no que diz respeito a sua fitogeografia e composição faunística (Roque et al. 2008; Roque e Jansen, 2008). Nesse cenário, a transmissão do parasito pode ser aumentada devido a dois processos subsequentes: (i) seleção e aumento da abundância de espécies competentes como reservatórios (aqueles que apresentam um perfil de infecção que favorece a transmissão do parasito) e, conseqüentemente, amplificação da população parasitária circulante; e (ii) maior possibilidade de triatomíneos locais se alimentarem sobre mamíferos com potencial de transmissibilidade do parasito e, portanto, aumento da prevalência de triatomíneos infectados.

Para parasitas multi-hospedeiros, como é o caso de *T. cruzi*, um ambiente com alta riqueza e abundância de espécies animais, o número de hospedeiros

competentes é diluído entre aqueles que não têm a mesma capacidade para transmitir um dado parasito, diminuindo o potencial de transmissibilidade ao vetor na área. Essa caracterização é apontada por Schmidt e Ostfeld (2001), como um fenômeno conhecido como efeito diluidor (“dilution effect”). O resultado é uma prevalência de infecção na fauna de vetores e mamíferos que, apesar de suficiente para manter o parasito, se mantém em baixos níveis, sendo a transmissão restrita a endemias focais (Keesing et al. 2006; Dobson et al. 2006).

O conhecimento do ciclo silvestre de transmissão e o monitoramento de animais silvestres frente a infecção por *T. cruzi*, principalmente antes e durante algum empreendimento, são medidas importantes para a previsão e tomada de decisões frente a possíveis alterações ambientais que levem ao aparecimento de novos casos. As alterações ambientais são inevitáveis, mas tornar seus efeitos previsíveis poderá minimizar bastante o seu impacto sobre a saúde de um modo geral.

Histórico da doença de Chagas na Amazônia

Atualmente, o perfil epidemiológico da doença de Chagas apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos e surtos na Amazônia por transmissão vetorial oral e contaminativa (extradomiciliar e intradomiciliar sem colonização). Com isso, evidenciam-se duas áreas geográficas onde os padrões de transmissão são diferenciados: i) a região originalmente de risco para a transmissão vetorial contaminativa, fora da região Amazônica, onde ações de vigilância epidemiológica, entomológica e ambiental devem ser concentradas, com vistas à manutenção e sustentabilidade da interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans* e por outros vetores passíveis de domiciliação; ii) a região da Amazônia Legal, onde a doença de Chagas não era reconhecida como problema de saúde pública na região (Secretaria de Vigilância em Saúde).

Embora o Brasil tenha reduzido de forma drástica os números de casos da doença de Chagas por transmissão vetorial contaminativa nas últimas décadas, entre 100 e 200 novos casos ainda são registrados anualmente. Mais de 95% ocorrem em apenas dois Estados: Pará e Amapá, sendo a transmissão vetorial oral a principal fonte (Ministério da Saúde, 2011).

Casos de doença de Chagas por transmissão vetorial oral que vêm ocorrendo na Amazônia apresentam frequência regular ao contrário das outras microepidemias já registradas em Teutônia/RS (Nery-Guimarães et al. 1968), Catolé do Rocha/PB (Shikanai-Yasuda et al. 1991), Navegantes/SC (Steindel et al. 2008) e Redenção/CE (Roque et al. 2008)

Na Amazônia e em outras regiões onde a transmissão vetorial contaminativa foi efetivamente controlada, a transmitida pela via vetorial oral é a principal forma de transmissão da doença de Chagas Aguda (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). Entre os casos estudados por Pinto et al. (2008), provenientes dos Estados do Pará, Amapá e Maranhão, 78,5% faziam parte de surtos e 21,5% eram casos isolados.

A doença é emergente na região amazônica e as microepidemias são citadas como sendo associadas majoritariamente ao consumo de açaí e outros alimentos (Coura et al. 2002; Monteiro et al. 2012). Não há ainda estratégias de controle da transmissão de *T. cruzi* neste bioma de características eco-epidemiológicas próprias da região amazônica.

Desde o início do século XX, tem-se o conhecimento da abundância de hospedeiros mamíferos potenciais reservatórios e vetores triatomíneos na Amazônia brasileira (Aguilar et al. 2007; Coura et al. 2012). Espécies de mamíferos naturalmente infectados tem sido identificadas na região. No entanto, o primeiro caso humano autóctone na região foi registrado somente em 1969, na cidade de Belém, no estado do Pará (Shaw et al. 1969; Briceño-León 2007). Desde então, casos autóctones foram relatados em número crescente (Yoshida et al. 2011).

Uma revisão de casos identificados pelo Instituto Evandro Chagas no período de 1968 a 2005 demonstrou a ocorrência de 442 casos autóctones, sendo 437 agudos (11 óbitos). A distribuição de casos por unidade federativa foi: 302 (68%) no Pará, 98 (22%) no Amapá, 25 (6%) no Amazonas, 9 (2%) no Maranhão e 8 (2%) no Acre. Dos 437 casos de doença de Chagas aguda (DCA), 311 (71%), estão relacionados às 62 microepidemias com provável transmissão associadas à ingestão de açaí consumido no Pará e Amapá (Valente et al. 1997; 2000).

O Ministério da Saúde em 2005 elaborou o Consenso Brasileiro da doença de Chagas que definiu linhas para a implantação da vigilância epidemiológica (VE) da doença de Chagas na região amazônica, tendo como base a detecção de casos por meio de lâminas para diagnóstico da malária, que são produzidas em larga escala

na região por conta do alto índice de casos. Essa proposta de vigilância teve seu início em julho 2006 no estado do Pará, região onde havia um maior número de registro de casos da doença, em torno de 15 a 20 casos anualmente até 2006 (Figura 2A).

No período de 2005 a 2006, foram notificados ao Programa Nacional de Controle de Doença de Chagas (PNCDCCh) 145 casos de Doença de Chagas Aguda no Brasil. Cerca de 63% ocorreram na região Amazônica, sendo 98% no Pará.

Entre 2007 e 2011, foram 849 casos de doença de Chagas Aguda no Brasil, ocorrendo especialmente na Amazônia Legal. No período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda. Destes, 70% (877/1.252) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (92/1.252), em 22% (276/1.252) não foi identificada a forma de transmissão (Secretaria de Vigilância em Saúde) (Figura 2B).

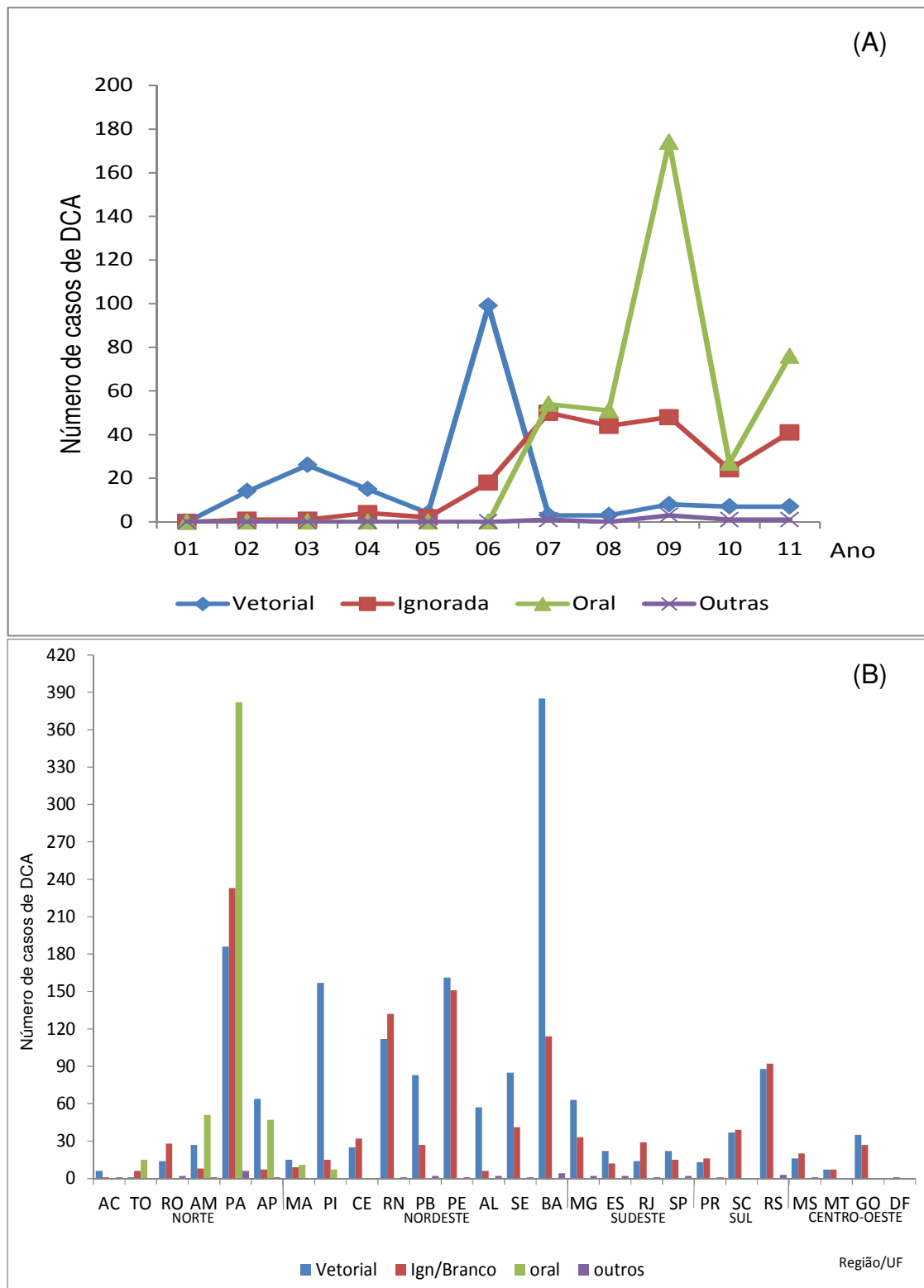


Figura 2. (A) Casos confirmados de DCA, segundo o ano de notificação e forma de transmissão no estado do Pará 2001 a 2011 (B) Casos confirmados de DCA por UF/região de infecção e forma de transmissão 2001 a 2011 (Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net (Dados de 2011 atualizados em 28/06/2012, dados parciais)).

Cenário da doença de Chagas no Pará

O programa de doença de Chagas no Estado do Pará (Figura 3) foi criado há cinco anos e, desde então, o número de casos se mantém em torno de 100 anualmente. O Pará é responsável por 80% dos registros da doença de Chagas no Brasil, segundo o Ministério da Saúde. Entre 2006 e setembro de 2012 foram registrados 844 casos distribuídos em 55 dos 143 municípios, destes 18 com mais de 10 casos neste período. Os municípios com maior incidência são: Belém (N = 179); Abaetetuba (N = 147); Breves (N = 74); Barcarena (N = 57); Ananindeua (N = 36); Igarapé Miri (N = 29). Os municípios e regionais prioritários para a transmissão da DCA no Pará são: Belém, Ananindeua, Paragominas, Barcarena, Moju, Tailândia, Igarapé-Miri, Abaetetuba, Ponta de Pedras, Breves, Curralinho, Anajás, Bagre e Mocajuba. Segundo a Secretaria Estadual de Saúde (SESPA), a forma de transmissão mais comum da doença no estado ainda é o consumo de alimentos contaminados.

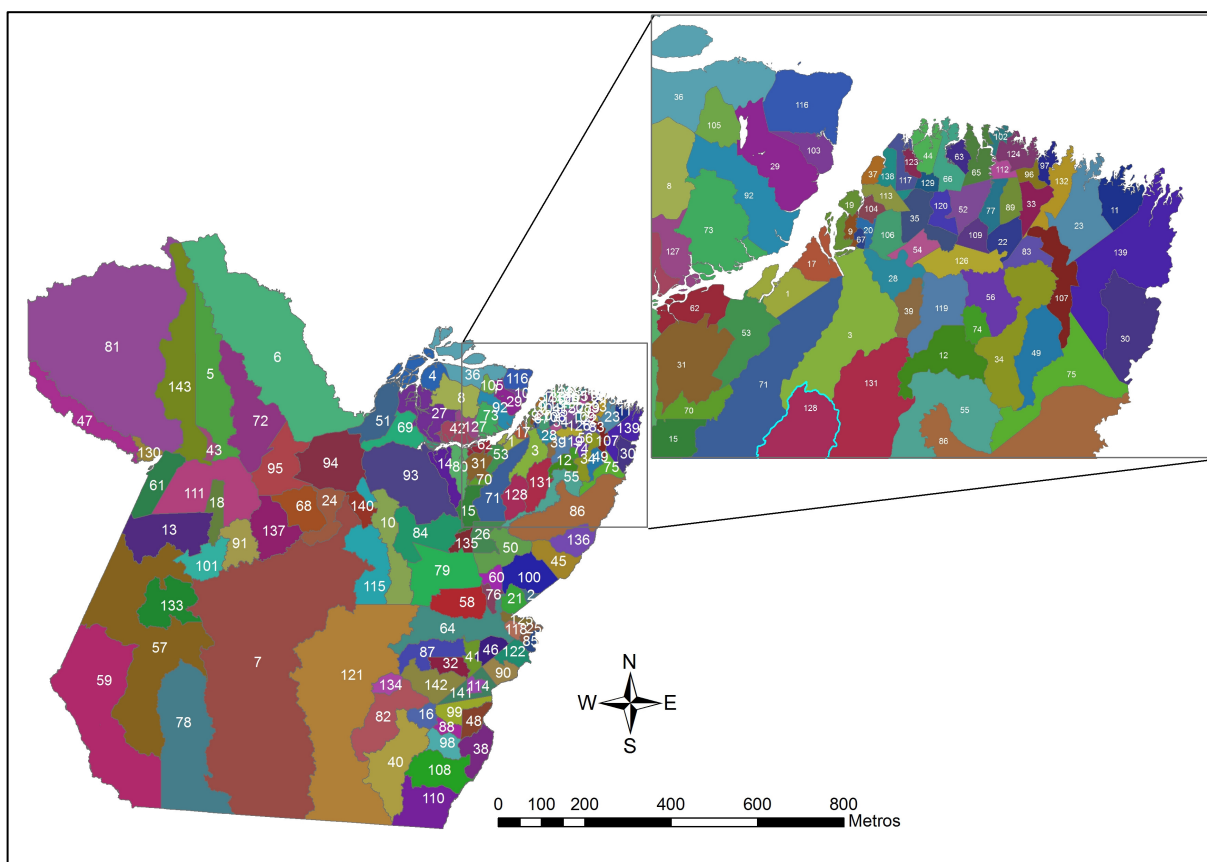


Figura 3. Divisão municipal do Estado do Pará (Fonte: <http://www.sepe.pa.gov.br/zee/Shapes.asp>).

Legenda

1_Abaetetuba	30_Cachoeira do Piriá	59_Jacareacanga	88_Pau d'Arco	117_São Caetano de Odivelas
2_Abel Figueiredo	31_Cametá	60_Jacundá	89_Peixe-Boi	118_São Domingos do Araguaia
3_Acará	32_Canaá dos Carajás	61_Juruti	90_Piçarra	119_São Domingos do Capim
4_Afuá	33_Capanema	62_Limoeiro do Ajuru	91_Placas	120_São Francisco do Pará
5_Alenquer	34_Capitão Poço	63_Magalhães Barata	92_Ponta de Pedras	121_São Félix do Xingu
6_Almeirim	35_Castanhal	64_Marabá	93_Portel	122_São Geraldo do Araguaia
7_Altamira	36_Chaves	65_Maracanã	94_Porto de Moz	123_São João da Ponta
8_Anajás	37_Colares	66_Marapanim	95_Prainha	124_São João de Pirabas
9_Ananindeua	38_Conceição do Araguaia	67_Marituba	96_Primavera	125_São João do Araguaia
10_Anapu	39_Concórdia do Pará	68_Medicilândia	97_Quatipuru	126_São Miguel do Guamá
11_Augusto Corrêa	40_Cumarú do Norte	69_Melgaço	98_Redenção	127_São Sebastião da Boa Vista
12_Aurora do Pará	41_Curionópolis	70_Mocajuba	99_Rio Maria	128_Tailândia
13_Aveiro	42_Curralinho	71_Moju	100_Rondon do Pará	129_Terra Alta
14_Bagre	43_Curuá	72_Monte Alegre	101_Rurópolis	130_Terra Santa
15_Baião	44_Curuçá	73_Muaná	102_Salinópolis	131_Tomé-Açu
16_Bannach	45_Dom Eliseu	74_Mãe do Rio	103_Salvaterra	132_Tracuateua
17_Barcarena	46_Eldorado dos Carajás	75_Nova Esperança do Piriá	104_Santa Bárbara do Pará	133_Trairão
18_Belterra	47_Faro	76_Nova Ipixuna	105_Santa Cruz do Arari	134_Tucumã
19_Belém	48_Floresta do Araguaia	77_Nova Timboteua	106_Santa Isabel do Pará	135_Tucuruí
20_Benevides	49_Garraão do Norte	78_Novo Progresso	107_Santa Luzia do Pará	136_Ulianópolis
21_Bom Jesus do Tocantins	50_Goianésia do Pará	79_Novo Repartimento	108_Santa Maria das Barreiras	137_Uruará
22_Bonito	51_Gurupá	80_Oeiras do Pará	109_Santa Maria do Pará	138_Vigia
23_Bragança	52_Igarapé-Açu	81_Oriximiná	110_Santana do Araguaia	139_Viseu
24_Brasil Novo	53_Igarapé-Miri	82_Ourilândia do Norte	111_Santarém	140_Vitória do Xingu
25_Brejo Grande do Araguaia	54_Inhangapi	83_Ourém	112_Santarém Novo	141_Xinguara
26_Breu Branco	55_Ipixuna do Pará	84_Pacajá	113_Santo Antônio do Tauá	142_Água Azul do Norte
27_Breves	56_Irituia	85_Palestina do Pará	114_Sapucaia	143_Óbidos
28_Bujaru	57_Itaituba	86_Paragominas	115_Senador José Porfírio	
29_Cachoeira do Arari	58_Itupiranga	87_Parauapebas	116_Soure	

No ano de 2006, foram notificados 91 casos da doença de Chagas Aguda (DCA), a maioria por transmissão vetorial oral. Em 2007, 130 casos de DCA e 4 óbitos e uma taxa de mortalidade de 3,1% (SESPA). Em 2008, foram notificados e confirmados no estado do Pará, 99 casos agudos de doença (28 apenas em Belém), sendo 65% (57 casos) relacionados à transmissão vetorial oral. Em 2009, segundo o resumo epidemiológico dos casos de DCA, foram notificados e confirmados no Estado do Pará, 242 casos de doença de Chagas. O número de casos em 2010, foram 81 com cinco vítimas fatais, uma taxa de letalidade de 6,2%. Em 2011, foram 141 casos registrados com oito mortes, segundo levantamento feito pela Secretaria de Estado de Saúde (SESPA), ou seja, uma taxa de letalidade de 5,7%. Até setembro de 2012 já foram confirmados 60 casos de DCA (Figura 4).

Outro fato peculiar, diz respeito a recorrente sazonalidade dos casos de DCA relacionados a transmissão vetorial oral que aumenta durante os meses da safra do açaí a partir de agosto, quando os índices pluviométricos são mais baixos. Os picos de DCA coincidem com a safra do açaí, sugerindo que há uma relação direta da incidência da doença com o consumo do fruto, quando manipulado de maneira incorreta (Figura 5).

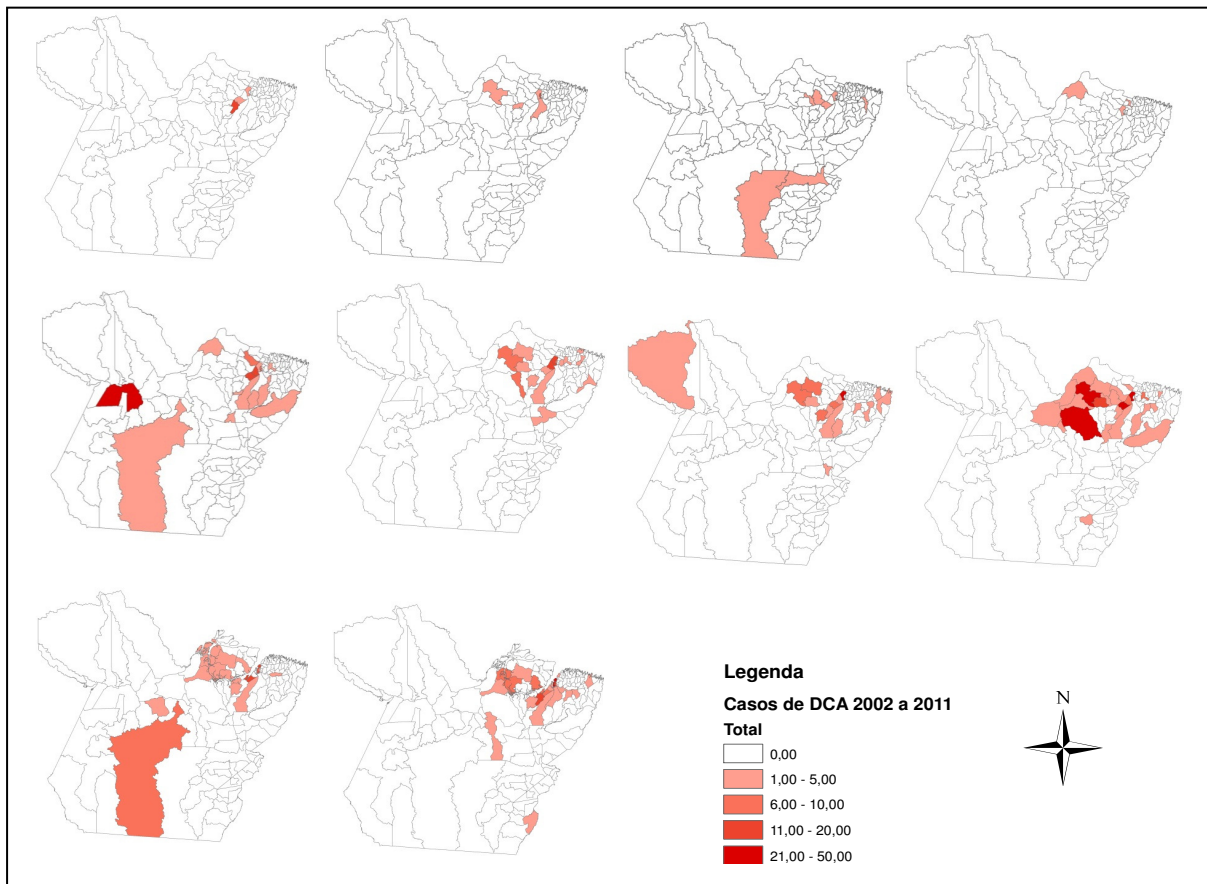


Figura 4. Distribuição espaço-temporal dos casos confirmados de DCA segundo o município de infecção no estado do Pará de 2002 a 2011 (Fonte dos dados: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net).

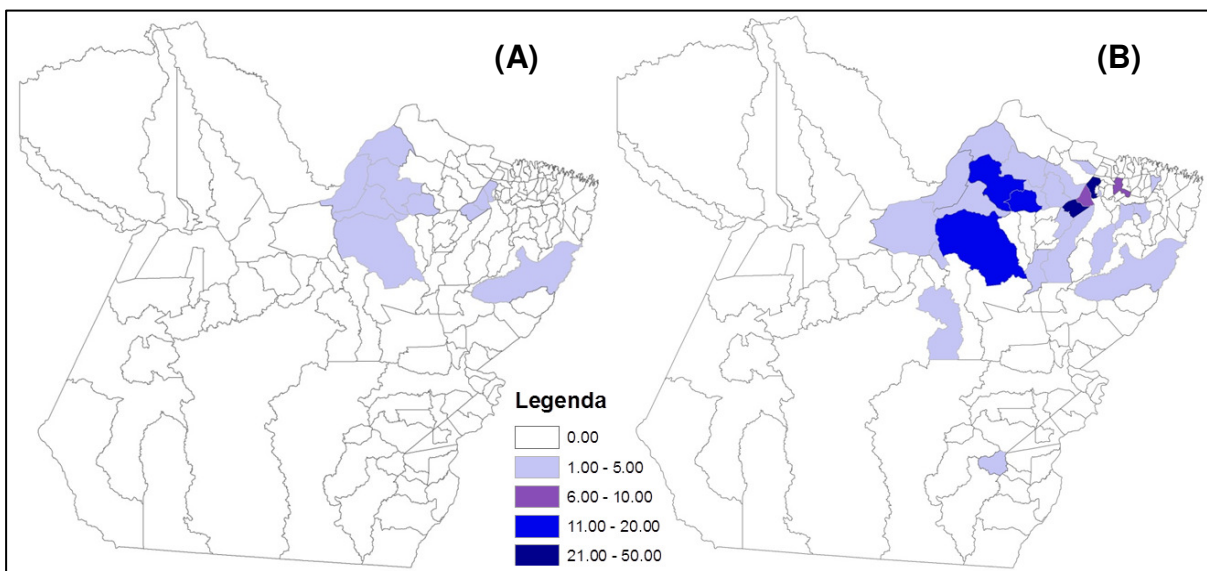


Figura 5. Sazonalidade dos casos de DCA por transmissão vetorial oral no estado do Pará, mapeados conforme os períodos de maior (A) e menor (B) índice pluviométrico.

Reservatórios

Desde a descrição de Carlos Chagas (1909) do tatu como “depositário de *T. cruzi* no mundo exterior” o conceito do que é um reservatório vêm sendo reavaliado periodicamente. A definição reservatório como uma espécie animal que, na natureza, é fonte de infecção de parasitas para o homem e animais domésticos sem sofrer danos já vem sendo abandonada. Atualmente é considerado reservatório uma ou um conjunto de espécies que garantem a dispersão e manutenção de um determinado parasita na natureza (Ashford, 1996). A condição de reservatório é temporal e espacial e este é um aspecto fundamental nos estudos dos ciclos de transmissão e de epidemiologia de uma determinada parasitose (Jansen e Roque, 2010). Neste contexto, os gambás (*Didelphis spp.*) são freqüentemente citados como principal reservatório de *T. cruzi*. De fato, essas espécies em algumas áreas podem ser excelentes reservatórios uma vez que apresentam parasitemia patente, refletida por hemocultivo positivo (Roque et al. 2008). Esta peculiaridade, no entanto não se repete em todos os ecossistemas. No Pantanal sul matogrossense, estudos apontam para importância dos quatis como reservatórios (Herrera et al. 2008) enquanto que em alguns fragmentos de mata atlântica essa função é desempenhada por primatas Callitriquideos (Lisboa et al. 2006).

A interação reservatório-parasito é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que está em constante mudança em função das alterações do meio ambiente. Isto significa que generalizar cenários epidemiológicos e medidas de controle pode resultar no seu insucesso. Atualmente, o termo reservatório ganhou novo entendimento e já não é mais definido como “a espécie animal que suporta o parasitismo sem sofrer danos”. Assim, são considerados reservatórios de *T. cruzi* as espécies de mamíferos que garantam a circulação do parasito na natureza, dentro de uma medida de tempo e espaço.

Estudos com hospedeiros reservatórios devem considerar as diferentes características epidemiológicas e padrões de infecção, os quais se modificam de uma região para outra em função: **(a)** das estratégias de vida e ciclo reprodutivo dos hospedeiros vertebrados; **(b)** do habitat e clima locais; **(c)** da presença, hábitos e capacidade vetorial do hospedeiro invertebrado; **(d)** das peculiaridades da interação

parasito-hospedeiro e **(e)** tempo e espaço em que acontecem os estudos (Ashford, 1996; Roque et al. 2005).

Para definir uma determinada espécie animal como reservatório de um determinado parasita, é necessário que se determinem os seguintes parâmetros:

Distribuição geográfica do hospedeiro: define a área máxima de ocorrência da parasitose (Mills e Childs, 1998). Assim é importante definir a composição faunística e a representatividade de cada espécie, bem como sua distribuição pelos estratos florestais (Jansen et al. 1999).

Identificação taxonômica dos hospedeiros: Interpretações epidemiológicas equivocadas podem surgir a partir de dados taxonômicos imprecisos dos seus hospedeiros (Mills e Childs, 1998). A correta identificação dos hospedeiros é de fundamental importância uma vez que mesmo espécies crípticas podem ter diferentes papéis na manutenção e dispersão de um parasito na natureza (Roque et al. 2005).

Perfil de infecção e sua distribuição na área de ocorrência dos hospedeiros: A prevalência da infecção na população de reservatórios pode ser muito alta em algumas localidades e muito baixa em outras áreas, que podem inclusive estar bem próximas. Também deve ser considerado que parasitos podem ser extintos periodicamente em uma determinada população de reservatórios e sejam re-introduzidos algum tempo mais tarde (Mills e Childs, 1998). A dinâmica e os fatores que controlam estes processos são ainda desconhecidos, mas indicam que o estudo longitudinal é fundamental para esclarecer o padrão temporal e espacial da parasitose (Vaz et al. 2007). Em diferentes localidades uma mesma espécie de mamífero pode desempenhar distintos papéis na manutenção do parasito na natureza (Herrera et al. 2005).

Análise regional do parasito e reservatórios em distintos ecossistemas dentro de um mesmo bioma: Indica o grau de generalismo ambiental do hospedeiro e, conseqüentemente, os habitats de risco e a possibilidade de “spillover” da parasitose. Existem cenários onde a transmissão do parasito é focal, às vezes restritos a “Hot spots” (zonas quentes) em que a transmissão é extremamente bem

sucedida, ao lado de outros onde a transmissão não ocorre (Weiss e McMichael, 2004; Jones et al. 2008).

Prevalência da infecção entre as distintas composições demográficas dos hospedeiros: Com esta informação é possível determinar se a infecção está acontecendo (caso esteja em altos índices em animais jovens) ou a possibilidade de dispersão do parasito. Tomando como exemplo (a) os gambás são descritos como animais nômades, no entanto, os machos têm um comportamento nômade muito mais acentuado do que as fêmeas. (b) primatas vivem em grupos e tem um comportamento territorialistas. As taxas de infecção podem variar entre os grupos, e este é outro aspecto que deve ser considerado. Essas diferenças demográficas apontam para a dinâmica das populações de hospedeiros no tempo e espaço, ajudam a prever oscilações na transmissão baseada nas flutuações sazonais populacionais dos principais hospedeiros (Noireau et al. 2009).

Dinâmica das populações de hospedeiros no tempo: Estudos longitudinais para: a) identificar os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo; b) flutuação sazonal; c) estabilidade da infecção; d) transmissibilidade (Haydon et al. 2002).

A importância da utilização de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) silvestres como bioindicadores de parasitos multi-hospedeiros, reside no fato que esses animais são abundantes e, quando susceptíveis a infecção de um dado parasito, podem refletir o impacto das alterações no ambiente, com alterações em suas taxas de prevalência/incidência da infecção atuando, dessa forma, como sentinelas da saúde ambiental (Dobson et al. 2006). Vale lembrar que, o encontro de uma espécie animal infectada ainda não define o seu papel na rede de transmissão - este atributo dependerá: das peculiaridades desta interação parasita-hospedeiro e do perfil da infecção. O conjunto desses fatores vai resultar numa maior ou menor competência da espécie animal em questão na manutenção e/ou transmissão do parasita. Um hospedeiro reservatório pode estar relacionado com a expansão da população parasitária, caso a população parasitária se amplie neste hospedeiro a

ponto de aumentar a chance de sua transmissão com o conseqüente surgimento de surtos epidêmicos ou epizooticos.

No caso de *T. cruzi* esta condição é expressa por altas parasitemias - caso a população parasitária se mantenha em níveis baixos no hospedeiro, de forma a estar pouco acessível ao vetor, este hospedeiro garantirá a manutenção do parasita na natureza, em níveis endêmicos ou enzoóticos. As espécies envolvidas com esta situação são descritas como hospedeiros reservatórios amplificadores, contrapondo àquelas espécies que mantém as populações parasitárias, mas são menos competentes para transmitir ao vetor (hospedeiros mantenedores). Sabe-se que as espécies que apresentam ambos os perfis são complementares dentro de um "Sistema Reservatório" capaz de manter as populações parasitárias e que hospedeiros "mantenedores" podem atuar como transmissores em situações especiais, como quando sofrem doenças outras debilitantes que podem levar a um aumento significativo da parasitemia patente (Jansen e Roque, 2010).

Outro aspecto importante que deve ser avaliado é a abundância relativa dos animais infectados. De fato, uma espécie infectada que apresente uma alta abundância relativa tem maior competência como reservatório em um determinado local do que outra, cujo número e biomassa sejam pouco expressivos. Mais ainda, sabe-se e deve ser sempre considerado, que as redes de transmissão de parasitas variam no tempo e espaço e isso vale principalmente para *T. cruzi*, parasita generalista e heterogêneo.

Cães como hospedeiros sentinela

O atual cenário da doença de Chagas exige que consideremos as micro-particularidades regionais, as quais norteiam as ações de educação em saúde. Além disso, fatores comuns às mais diversas áreas de ocorrência de surtos (fator sentinela) devem ser propostos, validados e utilizados pelos gestores de saúde na definição das áreas com maior risco para emergência de casos. Sem considerar estes dois aspectos, não há subsídios para que seja proposto um sistema efetivo de vigilância.

Uma espécie sentinela é aquela que tenha sido selecionada para fornecer informações sobre um ecossistema com base a refletir alterações ambientais

(mudanças climáticas, destruição do habitat) (Aguirre, 2009). O monitoramento da espécie sentinela é um eficiente sinalizador de áreas que necessitam de um trabalho mais aprofundado de investigação epidemiológica e de implementação de medidas de controle e educação sanitária (Roque et al. 2008).

Em regiões com altas prevalências da infecção por *T. cruzi* em triatomíneos e em mamíferos silvestres, os cães e mamíferos peri-domiciliares são mais expostos à infecção e, portanto, podem sinalizar que a última barreira entre o ciclo de transmissão silvestre e a área de atuação do homem foi transposta, ou seja, existe risco de infecção deste. Neste contexto, o acompanhamento longitudinal através de inquéritos sorológicos dos animais domésticos e peri-domiciliares é proposto como um possível método para se estimar taxas de prevalências/incidências dos animais silvestres e eventualmente das possíveis oscilações destas ao longo do tempo de infecção destes por *T. cruzi*. A utilização de mamíferos domésticos como animais sentinela em doença de Chagas já foi proposta e utilizado na Venezuela (Crisante et al. 2006), Argentina (Gurtler et al. 2007), México (Estrada-Franco et al. 2006; López-Céspedes et al. 2012), Panama (Pineda et al. 2011) e Brasil (Roque et al. 2008; Rocha et al. 2012). A definição de espécies sentinelas otimiza as ações, diminui gastos e evita interferências desnecessárias (Aguirre, 2009).

No Brasil, cães, gatos, porcos e caprinos são principais mamíferos domésticos investigados frente à infecção por *T. cruzi*. Cães e gatos podem ser excelentes reservatórios de *T. cruzi*, mas no Brasil muito raramente são obtidos hemocultivos positivos nesses animais (Noireau et al. 2009). Situação oposta pode ser observada na região do Gran Chaco Argentino, onde esses animais representam os principais amplificadores das populações parasitárias de *T. cruzi* (Gurtler et al. 2007). Caprinos no Piauí (Herrera et al. 2005), porcos em Cachoeira do Arari/PA (Roque et al. 2008) e Yuacatan/México (Jiménez-Coello et al. 2012) e gatos na Península Yucatan/México (Longoni et al. 2012) também se infectam com *T. cruzi*, como observado pelas taxas de infecção. Em relação aos porcos, apesar de estarem expostos ao ciclo de transmissão, há apenas dois relatos disponíveis de isolamento de *T. cruzi* (Salazar-Schettino et al. 1997; Herrera et al. 2011) e seu papel como reservatório ainda precisa ser estudado.

A destruição dos ecossistemas tem levado as populações de espécies de mamíferos silvestres e vetores a uma restrição de habitats e fontes alimentares,

além de promover um maior contato com o homem e animais domésticos. Outro aspecto a considerar é a escassez de fontes alimentares para triatomíneos silvestres devido à perda de habitat, fazendo com que esses insetos invadam áreas domiciliadas em busca de alimento, onde os animais domésticos estão mais expostos que o homem (Roque et al. 2008).

Uma abordagem geoespacial na definição de área de risco de DCA

Desde a década de 1980, várias tecnologias voltadas à modelagem e representação de fenômenos espaciais tornaram-se disponíveis para pesquisa e aplicações eco-epidemiológicas, incluindo Sistemas de Informação Geográfica (SIG), Sensoriamento Remoto (SR), Sistemas de Posicionamento Global (GPS), imagens de satélite, geoestatística e outras estatísticas espaciais (Bavia et al. 2005; Margonari et al. 2006). Essas tecnologias têm sido aplicadas com sucesso para estudar, explicar e prever padrões espaço-temporais de distribuição de doenças, parasitos, vetores, fatores ambientais, sociais e econômicos e suas interações com meio ambiente (Kitron et al. 2006, Vazquez-Prokopec 2009; Khan 2010; Coutinho et al. 2012). O desenvolvimento das tecnologias de mapeamento digital e análise espacial, particularmente no contexto dos Sistemas de Informações Geográficas (SIG), tem possibilitado relacionar fatores demográficos, geográficos e fitofisionômicos à ocorrência de doenças (Najar e Marques 1998).

Os SIGs possibilitam a descrição de processos ambientais e o estabelecimento de uma complementariedade de fatos com expressão geográfica que possibilitam uma análise globalizada de riscos à saúde, através de operações espaciais sobre um conjunto de dados georreferenciados dos ambientes biótico e abiótico. Essas operações espaciais são realizadas sobre os planos de informações que permitem observar a distribuição espacial dos problemas parasitológicos, epidemiológicos e ambientais promovendo a integração dessas variáveis e correlacionando informações. Dentre os benefícios da utilização dos SIGs na área de saúde, podemos citar: i) integrar e consolidar bases de dados sobre saúde e meio ambiente; ii) realizar análises espaciais para a interpretação de hipóteses; iii) representar fenômenos epidemiológicos e parasitológicos por meio da semiologia gráfica. Esses sistemas facilitam o entendimento de fatos e expressões geográficas

bem como a avaliação para tomada de decisões nas ações políticas na saúde pública. Dados espaciais compreendem 3 componentes: localização (posição no espaço 1D, 2D, 3D....nD), ii) atributos (características gerais ou específicas que individualizam o atributo) e iii) instante ou período no tempo (quando ou por quanto tempo a posição ou determinado atributo é válido).

Utilizando-se esta espécie de dado como matéria prima a ênfase da análise espacial é mensurar propriedades e relacionamentos, levando em conta a localização espacial do fenômeno em estudo de forma explícita (Câmara et al. 2001).

Vale ressaltar, na questão espacial a importância da compatibilização dos sistemas geodésico, sistemas de coordenadas e sistemas de projeção dos objetos que formam a base de dados na construção das ferramentas de SIG. A integração de dados de diferentes fontes, gerados pelos mais diversos procedimentos, com o objetivo de compor a base de dados de um projeto, traz consigo algumas preocupações constantes dos usuários de SIG. O procedimento por parte do usuário é analisar seus dados antes de colocá-los no universo digital (D'Alge, 2001).

É importante que a informação a respeito dos parâmetros da projeção cartográfica e do datum planimétrico seja armazenada de forma explícita e usada coerentemente quando necessário. Portanto, é importante o cuidado que o usuário deve ter com relação ao sistema de referência de seus dados.

Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e Modelagem de Nichos Ecológicos (MNE) foram utilizados para definir a distribuição de várias doenças incluindo a Esquistossomíase (Bavia et al. 1999; Malone et al. 2001; Scholte et al. 2012), Malária (Kiang et al. 2006), doença de Chagas (Xavier et al 2007; Mischler et al. 2012) Leishmanioses (Bavia et al. 2005, Rossi et al. 2007, Gil et al. 2010) e vetores (Lambert et al. 2008; Slimi et al. 2009; Barbu et al. 2010; Abad-Franch et al. 2010; Santana et al. 2011). Essas tecnologias (SIG e MNE) podem auxiliar na definição da distribuição e previsão de risco de doença de Chagas, por extrapolação para outras áreas com semelhantes fatores ambientais e sócio-econômico, além de mapas preditivos para a alocação de recursos pela vigilância epidemiológica e controle (Mischler et al. 2012).

A análise espacial da distribuição geográfica de *Triatoma infestans* revelou a importante associação entre variáveis ambientais e a distribuição de vetores de *T.*

cruzi, assim como a detecção das áreas de risco de transmissão da doença de Chagas (Gorla, 2002). A utilização dessa ferramenta também foi proposta na identificação de áreas de sobreposição de mamíferos e triatomíneos naturalmente infectados por *T. cruzi* e na identificação de áreas de risco de doença de Chagas no município de Russas, Ceará (Coutinho et al. 2012). Estudos demonstram que a modelagem espacial pode ser usada em estudos de prevalência e incidência, como um método para definir as áreas de alto, moderado ou baixo risco de doença (Mischler et al. 2012).

Roux e colaboradores (2011a) aplicaram a análise exploratória espacial para identificação de padrões espaciais da presença, abundância e dispersão dos insetos vetores da doença de Chagas no município de Iraquara, Bahia. Este método também foi proposto para análise de dados multi-variáveis e seleção de possíveis variáveis explicativas na modelagem espacial da dispersão de *Triatoma sordida* e *Panstrongylus geniculatus*, vetores da doença de Chagas, no município de Iraquara, Bahia (Roux et al. 2011b).

Interpolação

O princípio da interpolação espacial é a Primeira Lei da Geografia. Formulada por Waldo Tobler, essa lei determina que tudo esteja relacionado com o resto, mas coisas próximas são mais relacionadas que coisas distantes. A propriedade formal que mede o grau no qual coisas próximas e distantes estão relacionadas é a autocorrelação espacial. A maioria dos métodos de interpolação aplica autocorrelação espacial dando a pontos de amostra próximos mais importância que aqueles mais distantes. O método de interpolação espacial consiste em estimar os valores de uma variável, em locais não amostrados, com base em observações em locais conhecidos, utilizando-se um modelo da covariância de uma função aleatória (Berke, 2004). Este método é amplamente utilizado na meteorologia, a fim de interpolar valores de dados climáticos de estações de observação, e também têm sido utilizados em epidemiologia espacial para modelar a distribuição de parasitas, vetores e doenças, tais como *Ixodes scapularis* que transmite a doença de Lyme (Nicholson e Mather, 1996), malária (Kleinschmidt et al. 2000), Equinococose alveolar (Pleydell et al. 2004), moscas tsé-tsé, que transmitem a tripanosomíase

humana Africana (Sciarretta et al. 2005), *Calicophoron daubneyi*, o agente causador da paramphistomosis em ruminantes (Biggeri et al. 2004), *Oncomelania hupensins*, o caramujo hospedeiro intermediário do *Schistosoma japonicum* (Zhang et al. 2005), bem como perfis de risco e previsão espacial de co-infecção de *Schistosoma mansoni* e ancilostomíase (Raso et al. 2006).

A utilização de análise exploratória espacial e interpolação espacial em análises espaciais de parasitoses e dados epidemiológicos e ambientais se mostrou satisfatória para expressar a relação entre as condições epidemiológicas e ambientais estudadas, além de evidenciar uma alta correlação entre as variáveis analisadas, gerando mapas resultantes na representação da distribuição de parasitoses (Nuvolone et al. 2011). Análise espacial utilizando mapas gerados por interpolação permitiu identificar a distribuição das áreas endêmicas de esquistossomose, bem com a distribuição da prevalência humana de esquistossomose, distribuição de exemplares infectados e cursos d'águas, refletindo a situação atual das áreas com maior ou menor risco na Província de Anhui, na China (Gao et al. 2011).

Álgebra de Mapas

Álgebra de Mapas, introduzida na década de 1980 por Tomlin (1983, 1990), consiste em realizar análise espacial como a aplicação de uma função matemática aplicada a uma série de mapas (ou camadas), que representa a mesma área geográfica, cada um com o seu próprio atributo. As etapas da álgebra de mapas são compostas por variáveis de entrada (camadas de mapas, representando atributos específicos), expressões (Equação 1) e funções, além de expressões e funções (Equação 2), aplicadas a uma ou mais variáveis, podendo ainda ter parâmetros adicionais. A resultante da álgebra de mapas é uma nova variável dependente que pode ser usada em análises subseqüentes, ou vista como uma camada de um novo mapa (Bruns e Egenhofer, 1997).

$$\text{camada0} \leftarrow (\text{camada1} + \text{camada2}) * \text{camada3} \quad (1)$$

$$\text{camada0} \leftarrow \text{operações X} (\text{camada1}, \text{camada2}, \dots, \text{camadaN}, \text{parâmetros}) \quad (2)$$

A sintaxe das expressões da álgebra de mapa, e como são construídas, varia consideravelmente com a implementação. Embora os conceitos e funcionalidades continuem as mesmas, as interfaces de usuário na álgebra de Mapas mostram uma grande diversidade (Bruns e Egenhofer, 1997).

Análise espacial pela álgebra de mapas permitiu identificar características ambientais associadas com *Celastrus orbiculatus* e demonstrar o uso desta informação para prever a ocorrência de *C. orbiculatus* de uma ampla área no sul de Illinois, EUA (Pande et al. 2006).

Método Fuzzy como nova ferramenta no diagnóstico ambiental dos fatores de risco de DCA

Serão abordados aqui os principais conceitos envolvidos na técnica de inferência fuzzy, como lógica fuzzy, conjuntos fuzzy ou função fuzzy, variáveis lingüísticas e operadores fuzzy. Além das vantagens do modelo Fuzzy sobre o Booleano e as diferenças entre os conceitos probabilidade e possibilidade.

As vantagens do modelamento fuzzy são inúmeras quando comparadas aos modelamentos convencionais que forçam os especialistas a definir regras dicotômicas rígidas com contatos normalmente artificiais que diminuem a habilidade de articular eficientemente soluções para problemas complexos, tão comuns em processos naturais.

A metodologia clássica de mapeamento determina um limite para representar fronteira entre classes mapeadas, não havendo áreas de transição nos mapas booleanos (limites descontínuos). Porém, diversos fenômenos apresentam áreas de transição (limites contínuos) que deveriam ser representados de forma mais significativa, como o mapeamento de fenômenos ambientais, biológicos, distribuição de áreas de risco a transmissão de doenças, dispersão de vetores, definição de áreas de peridomicílio, enfim variáveis que apresentem características contínuas.

Em mapas bidimensionais delimitados cartograficamente por polígonos, alguns problemas ambientais podem não ser modelados realisticamente devido a passagens abruptas entre os parâmetros mapeados. Na representação de fenômenos naturais como a distribuição de áreas de risco à transmissão de doenças ou à dispersão de vetores, nem sempre é possível obter a real distribuição se

utilizada a forma booleana de representação, pois esses fenômenos estão distribuídos não uniformemente, existindo variações em suas bordas ou limites.

Segundo Lagacherie et al. (1996), as variações nessas bordas são mais representativas do que no interior do polígono de representação. As bordas nos mapas estão associadas a dúvidas, inerentes ao objeto ou fenômeno identificado, e as incertezas causadas por limitações de observações (Hadzilacos, 1996).

A visão dicotômica (booleana) de modelo é assumida pela maioria dos Sistemas de Informação Geográfica que consideram que fenômenos naturais podem ser modelados por objetos discretos, tais como pontos, linhas e polígonos ou pixels, os quais têm atributos exatos. Essa visão espacial de dados imprecisos para dados rígidos introduz erros na representação dos processos de inferência espacial (Altman, 1994).

A teoria de conjuntos fuzzy é baseada no fato de que os conjuntos existentes no mundo real não possuem limites precisos. Um conjunto fuzzy é um agrupamento impreciso e indefinido, no qual a transição de não pertinência para pertinência é gradual, não abrupta. A característica fuzzy implica em existência de imprecisão, incerteza, definições qualitativas. A teoria fuzzy de conjuntos provê um método para manipulação de conjuntos, cujos limites são imprecisos ao invés de restritos. A incerteza de um elemento, isto é, seu grau fracionário de pertinência, pode ser concebido como uma medida de possibilidade, ou seja, a possibilidade de que um elemento seja membro do conjunto. O conceito de possibilidade não é o mesmo que o de probabilidade. A probabilidade expressa a chance de que um elemento seja membro de um conjunto, sendo também expressa no intervalo numérico $[0,1]$. Desta forma, a dicotomia da concepção clássica, na qual um elemento x pertence ou não pertence a um conjunto é abandonada, cedendo lugar ao conceito de pertinência.

A introdução dos conjuntos fuzzy para lidar com conceitos inexatos foi primeiramente proposta por Zadeh (1965). A concepção da lógica fuzzy surgiu da preocupação de Zadeh com a rápida diminuição da qualidade da informação fornecida por modelos matemáticos tradicionais, conforme aumenta a complexidade do sistema que advém do modo no qual as variáveis do sistema são representadas.

As primeiras aplicações da lógica Fuzzy datam de 1974, sendo hoje aplicada nas ciências ambientais, medicina, engenharia e em outras ciências. Matematicamente essa lógica, que também é conhecida como lógica nebulosa ou

lógica difusa, tem como objetivo modelar, de modo aproximado, o raciocínio humano, manipulando informações em um ambiente de incerteza e imprecisão, fornecendo respostas aproximadas baseadas em conhecimento inexato. Assim, sua utilização é indicada sempre que se tiver que lidar com ambigüidade, abstração ou ambivalência em modelos matemáticos (Anjos, 2008).

Formalmente um conjunto fuzzy A é descrito por Zadeh (1965) como sendo:

$$A = \{(x, \mu_A(x)); x \in U, \mu_A(x) \in [0,1]\}$$

onde $\mu_A(x)$ é uma função de pertinência que determina com que grau x está em A , ou seja:

$\mu_A(x) = 1$ x pertence totalmente ao conjunto A ;

$0 < \mu_A(x) < 1$ x pertence parcialmente ao conjunto A ;

$\mu_A(x) = 0$ x não pertence ao conjunto A .

U denota um espaço definido de n objetos e o conjunto nebuloso A em U ; $\mu_A(x)$ é a função de pertinência conhecida como grade de associação de x em A , isto é, uma graduação do membro x em A , que associa cada ponto de U a um número real no intervalo $[0,1]$ (Zadeh, 1965).

Nessa associação, o valor 1 representa o enquadramento perfeito ao conjunto difuso e 0 corresponde ao membro que não pertence ao conjunto, por conseguinte, os valores entre 0 e 1 representam um enquadramento ao conjunto, porém esse enquadramento não é totalmente perfeito. O valor da função de pertinência $\mu_A(x)$ de um objeto x em A significa dizer o grau de compatibilidade de um parâmetro (variável) relacionado ao conjunto A e ao objeto x , ou seja, $\mu_A(x)$ avalia o quanto x pode pertencer ao conjunto A (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008).

Para que essa relação seja estabelecida é necessário que haja uma função de pertinência relacionando os conjuntos. Esta função é o componente crucial de um conjunto fuzzy e muitas operações são definidas em conformidade com a mesma (Zadeh, 1965 *apud* Anjos, 2008).

A lógica fuzzy está contida na categoria de análises algébricas de mapas não cumulativas ou análises lógicas, junto com a simultaneidade booleana e a

probabilidade bayesiana (Paula e Souza, 2007). Os produtos gerados por essa categoria de análise são mapas integrados (como os mapas gerados através do ajustamento de uma superfície por interpolação espacial), ao invés de mapas fundidos gerados pela álgebra de mapas cumulativos.

Conforme Katinsky (1994), a lógica fuzzy pode ser definida como a parte da lógica matemática dedicada aos princípios formais do raciocínio incerto ou aproximado, portanto mais próxima do pensamento humano e da linguagem natural.

Silva (2001) refere-se aos componentes naturais, onde os limites entre superfícies contínuas não ocorrem bruscamente na grande maioria das vezes. Percebe-se uma gradual passagem de uma característica para a outra, criando-se áreas ambíguas.

Segundo a modelagem booleana (abruptas) e fuzzy (graduais) as incertezas nos valores dos atributos dos mapas causam erros nos resultados das inferências espaciais efetuadas. Os métodos booleanos estão muito mais sujeitos à propagação de erros do que os equivalentes fuzzy, e a utilização da técnica fuzzy pode reduzir a propagação de erros por meio de modelos lógicos, fornecendo cenários mais confiáveis (Burrough e Heuvelink, 1992). A figura 6 ilustra a diferença existente no que se refere à fronteira entre a lógica Booleana e a lógica fuzzy.

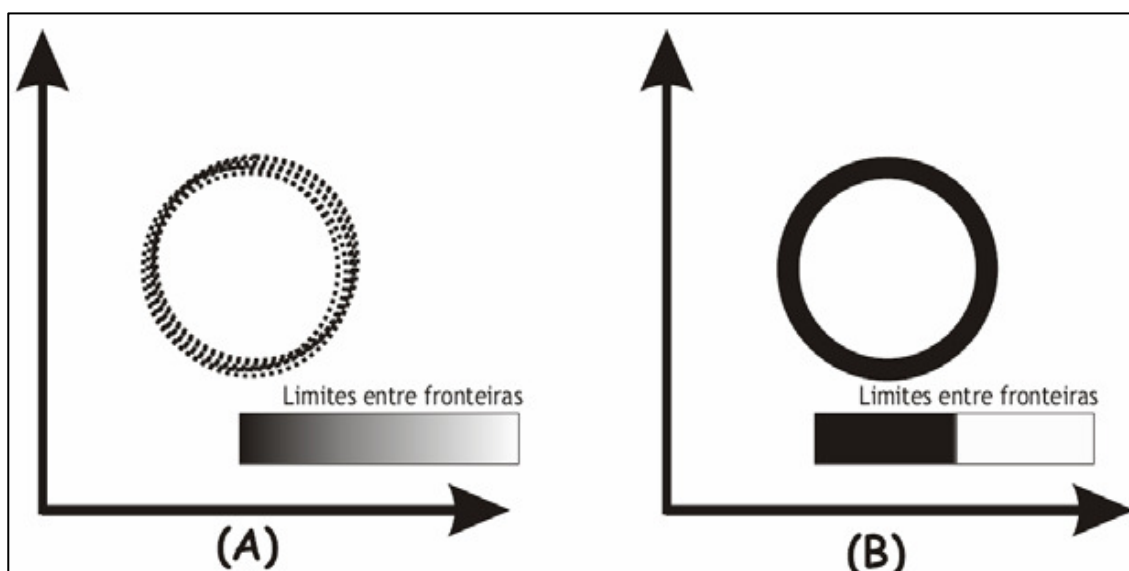


Figura 6. Diferença entre a Fronteira Fuzzy (A) e Booleana (B). Modificado de Burrough & McDonnell *apud* Ruhoff (2004).

A inferência geográfica fuzzy apresenta uma grade de valores relativos, que supera tecnicamente o processo de intersecção de conjuntos espaciais, como operações booleanas de mesma ordem de grandeza. A grande vantagem reside na possibilidade de avaliar o espaço geográfico continuamente, e não através de limites rígidos, como em conjuntos de dados estáticos. Tal processo cria uma superfície de decisão, que representa uma variação da grandeza avaliada, como a vulnerabilidade ambiental, oferecendo uma flexibilidade muito maior sobre problemas espaciais (Ruhoff et al. 2005).

Funções de Pertinência

Um conjunto fuzzy é caracterizado por uma função de pertinência que assume valores dentro do intervalo $[0,1]$. Um conjunto fuzzy é dito normal quando ao menos um dos elementos tem pertinência completa ao conjunto e uma variável fuzzy é convexa se ela for convexa para todos os níveis de pertinência (Garcia et al. 2009). Enquanto na teoria de conjuntos clássica a função de pertinência assume apenas os valores zero, indicando que o elemento não pertence ao conjunto, ou um, indicando que o elemento pertence ao conjunto, na teoria de conjuntos fuzzy os elementos podem estar associados a graus de pertinência entre zero e um indicando que os mesmos podem pertencer parcialmente a um conjunto.

Seja U um conjunto universo não vazio ($U \neq \emptyset$). Um conjunto fuzzy A em U é caracterizado por sua função de pertinência:

$$\begin{aligned} \mu_A : U &\rightarrow [0,1] \\ x &\rightarrow \mu_A(x) \end{aligned}$$

sendo $\mu_A(x)$ interpretado como o grau de pertinência do elemento x no conjunto fuzzy A para cada $x \in U$ (Zadeh, 1965).

Como qualquer função da forma $\mu_A : U \rightarrow [0,1]$ pode ser associada a um conjunto fuzzy, a literatura já dispõe de famílias de funções de pertinência que são geralmente utilizadas, como as funções lineares (triangulares e trapezoidais), sigmoidais e gaussianas (Pedricz e Gomide, 1998 *apud* Anjos, 2008). Os formatos mais comumente utilizados para funções de pertinência são os triangulares, trapezoidais e gaussianos. Todas essas funções de pertinência apresentam

parâmetros ou pontos de controle que melhor modelam o que se pretende representar em qualquer das variações existentes para cada uma das funções apresentadas (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008). Por esta razão, nesta tese, apenas estes formatos serão descritos.

As funções de pertinência lineares, nas quais se enquadram funções triangulares e trapezoidais, são as mais simples de serem implementadas, sendo assim amplamente utilizadas (Eastman, 2001).

Segundo Benini (2007), em sistemas fuzzy cujos parâmetros podem ser completamente definidos por especialistas a escolha de funções triangulares e trapezoidais é mais comum, pois a idéia de se definir regiões de pertinência total, média e nula é mais intuitiva do que a especificação do valor médio e de dispersão, conceitos esses ligados as funções gaussianas.

A princípio, qualquer função que associe valores entre zero e um a elementos de um dado conjunto, pode ser tomada como função de pertinência. Entretanto, na escolha de tais funções, deve-se levar em conta o contexto em que estas serão utilizadas na representação das variáveis lingüísticas. Neste sentido, tanto o número quanto o formato das funções de pertinência devem ser escolhidos de acordo com o conhecimento sobre o processo que se quer estudar (Amendola et al. 2005).

Funções de pertinência triangulares

As funções de pertinência triangulares são caracterizadas por um terno (a, b, c), onde a e c determinam o intervalo dentro do qual a função de pertinência assume valores diferentes de zero e b é o ponto onde a função de pertinência é máxima (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008). A Figura 7 exibe uma função de pertinência triangular onde são destacados a, b e c. Nesta figura encontram-se no eixo vertical os valores da função de pertinência e no eixo horizontal os valores da variável que se quer estudar.

Funções triangulares: $f(x; a, b, c) = \max\left(\min\left(\frac{x-a}{b-a}, \frac{c-x}{c-b}\right), 0\right)$, onde a, b e c são

parâmetros que definem os pontos de inflexão da curva.

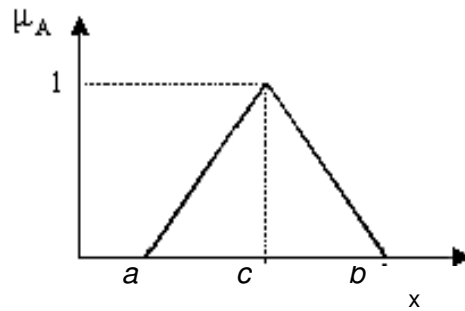


Figura 7. Função de Pertinência Triangular.

Funções de pertinência trapezoidal

As funções de pertinência trapezoidais são caracterizadas por um conjunto de quatro valores a , b , c e d , onde a e d determinam o intervalo dentro do qual a função de pertinência assume valores diferentes de zero e b e c determinam o intervalo dentro do qual a função de pertinência é máxima e igual a 1 (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008). A Figura 8 exibe uma função de pertinência trapezoidal onde são destacados os pontos a , b , c e d . Na Figura 8 encontram-se no eixo vertical os valores da função de pertinência e no eixo horizontal os valores da variável que se quer estudar.

Funções trapezoidais: $f(x; a, b, c, d) = \max\left(\min\left(\frac{x-a}{b-a}, 1, \frac{d-x}{d-c}\right), 0\right)$, onde a , b , c e d são parâmetros que definem os pontos de inflexão da curva.

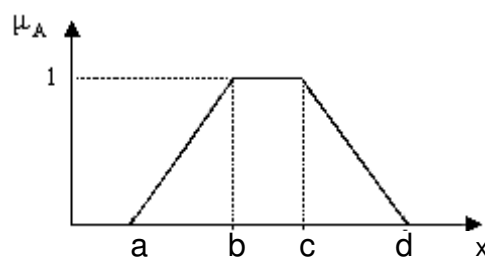


Figura 8. Função de Pertinência Trapezoidal.

Funções de pertinência Gaussianas

As funções de pertinência Gaussianas são caracterizadas pela sua média μ e seu desvio padrão σ . Este tipo de função de pertinência tem um decaimento suave para todo domínio da variável estudada. A figura 9 exibe uma função de pertinência Gaussiana (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008). Nesta figura encontram-se no eixo vertical os valores da função de pertinência e no eixo horizontal os valores da variável que se quer estudar.

$$\mu_A(x) = \exp \left\{ -1/2 (x - c/\sigma)^2 \right\}$$

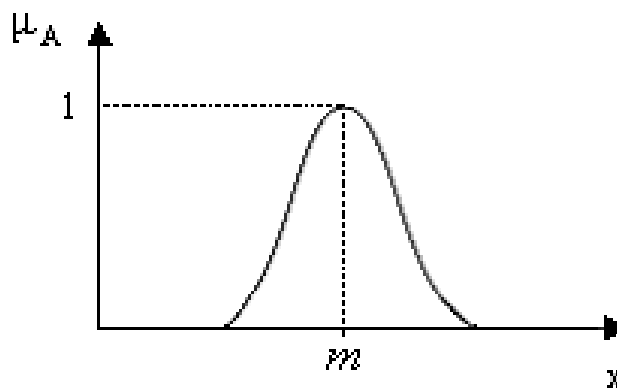


Figura 9. Função de pertinência Gaussiana.

Operações com Conjuntos Fuzzy

Como na lógica clássica dos conjuntos, o processamento de informações fuzzy também consiste de operações realizadas sobre os seus conjuntos. As operações básicas de união, intersecção e complemento são definidas por Zadeh (1965) como:

Sejam A e B dois conjuntos fuzzy definidos em um universo de discurso U com funções de pertinência $\mu_A(x)$ e $\mu_B(x)$, respectivamente.

A união entre os conjuntos A e B é dada pelo valor máximo entre $\mu_A(x)$ e $\mu_B(x)$, $\forall x \in U$, formalmente:

$$\mu_{A \cup B}(x) = \mu_A(x) \cup \mu_B(x) = \max(\mu_A(x), \mu_B(x)) \quad , \quad \forall x \in U$$

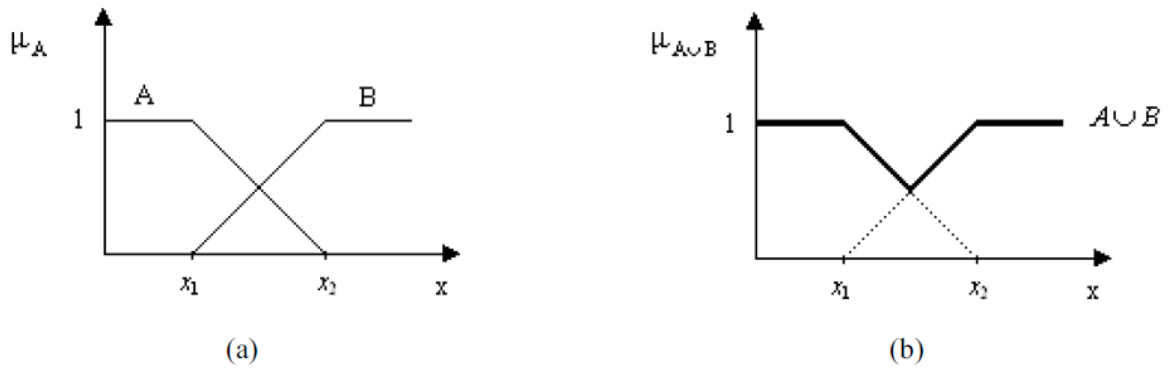


Figura 10. (a) Diagrama dos conjuntos A e B (b) Diagrama do conjunto união $A \cup B$.

A intersecção entre os conjuntos A e B é dada pelo valor mínimo entre $\mu_A(x)$ e $\mu_B(x)$, $\forall x \in U$, formalmente:

$$\mu_{A \cap B}(x) = \mu_A(x) \cap \mu_B(x) = \min(\mu_A(x), \mu_B(x)), \forall x \in U$$

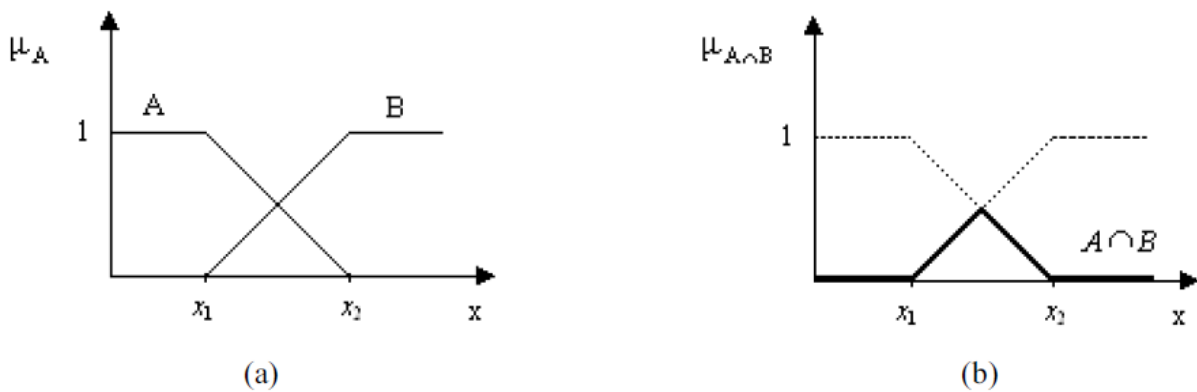


Figura 11. (a) Diagrama dos conjuntos A e B (b) Diagrama do conjunto intersecção $A \cap B$.

O complemento do conjunto A é dado pela subtração de $\mu_A(x)$ do valor unitário 1 para todo $x \in U$, formalmente:

$$\mu_{\bar{A}}(x) = 1 - \mu_A(x), \forall x \in U$$

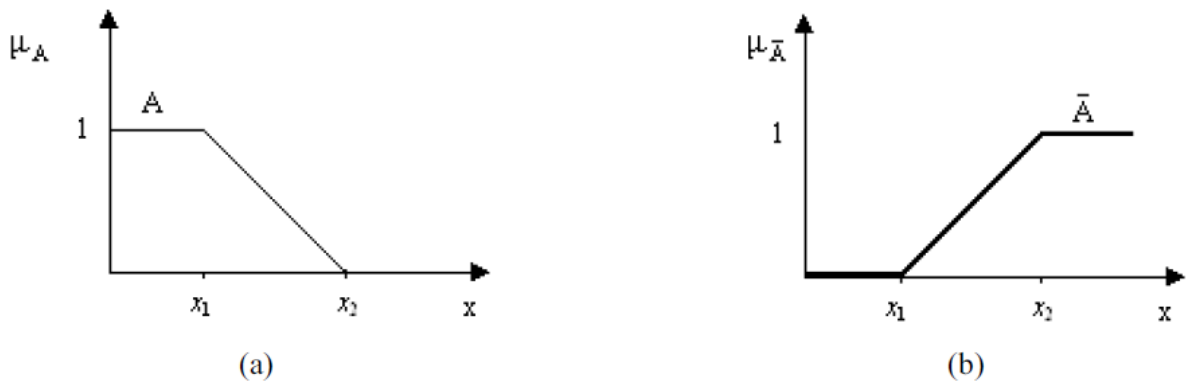


Figura 12. (a) Diagrama do conjunto A (b) Diagrama do conjunto complementar de A (\bar{A}).

Variáveis Linguísticas

As variáveis linguísticas são variáveis expressas qualitativamente, ou seja, são variáveis cujos valores são fornecidos ao sistema através de palavras ou frases, ao invés de números. Cada variável linguística (X) possui um conjunto de termos fuzzy associados a ela, sendo esses termos determinados pelo conjunto de valores que a variável pode assumir (Anjos, 2008). Como exemplo, a variável risco de transmissão de *T. cruzi* pode ter o conjunto de termos $T(X) = \{\text{baixo, médio, alto}\}$ que fornecem conceitos qualitativos a variável. Quantitativamente esses valores são expressos através de uma função de pertinência que os associam ao universo de discurso $U = [R_{\min}, R_{\max}]$.

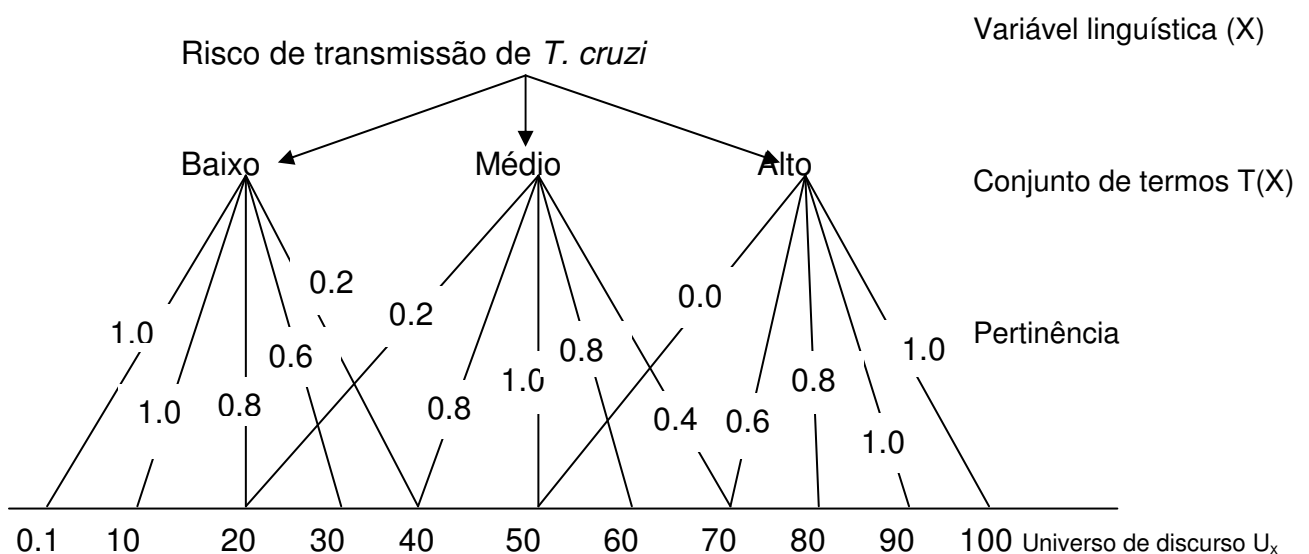


Figura 13. Variável linguística risco de transmissão de *Trypanosoma cruzi*.

A Figura 13 apresenta a variável lingüística com rótulo $X =$ risco de transmissão de *T. cruzi*, com os conjuntos de termos $T(X) = \{\text{baixa, média, alta}\}$ e um universo de discurso arbitrado $U = [0.1\%, 100\%]$. Assim, cada um dos valores pertencentes ao universo de discurso pode ser escrito como:

$$M(\text{baixa}) = \{(x, \mu_{\text{baixa}}(x)) \mid x \in [0.1\%; 40\%]\}$$

$$M(\text{média}) = \{(x, \mu_{\text{média}}(x)) \mid x \in [20\%; 70\%]\}$$

$$M(\text{alta}) = \{(x, \mu_{\text{alta}}(x)) \mid x \in [50\%; 100\%]\}$$

A Figura 14 ilustra três possíveis funções de pertinência para a variável lingüística com rótulo $X =$ “risco de transmissão de *T. cruzi*”, cada uma referente a um termo lingüístico do conjunto $T(X) = \{\text{baixo, médio, alto}\}$, sendo duas retangulares (baixa e alta) e uma triangular (média).

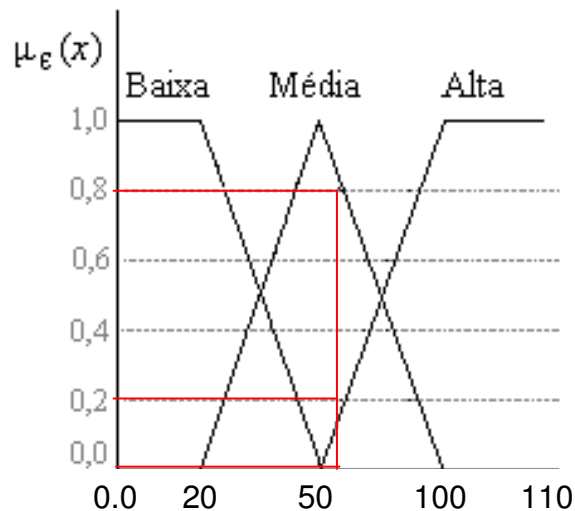


Figura 14. Funções de pertinência associadas a variável lingüística risco de transmissão de *T. cruzi*.

Por meio dessas funções, qualquer valor pertencente ao universo de discurso U pode ser escrito, por um único valor de pertinência relacionado a cada uma delas, como demonstrado para o valor de 60% de risco de transmissão:

$$\begin{cases} \mu_{\text{baixo}}(60) = 0.0 \\ \mu_{\text{médio}}(60) = 0.8 \\ \mu_{\text{alto}}(60) = 0.2 \end{cases}$$

Assim, a fuzzificação da medida 60%, ou seja, a conversão em valores compreensíveis para fuzzy é dada por:

$$60\% = 0.0 * \text{"baixa"} + 0.8 * \text{"média"} + 0.2 * \text{"alta"}$$

Regras Fuzzy

Baseado nas variáveis lingüísticas, um processo de inferência fuzzy permite elaborar sistemas através de um conjunto de regras fuzzy composto por proposições condicionais (Anjos, 2008). As regras fuzzy descrevem situações específicas que podem ser submetidas à análise de especialistas cuja inferência conduz a algum resultado desejado. Cada regra fuzzy, da mesma forma que uma afirmação clássica, é composta por uma parte antecedente ou premissa, proposições das quais saímos, e uma parte conseqüente ou de conclusão, proposição final a qual chegamos como conseqüência das relações expressas nos antecedentes (Ortega, 2001 *apud* Anjos, 2008). Diferentemente da teoria clássica dos conjuntos as regras que envolvem as variáveis de entrada associadas a um conjunto fuzzy podem ser parcialmente satisfeitas.

Segundo Benini (2007), uma inferência baseada em regras fuzzy pode ser compreendida como uma função que mapeia um conjunto de uma ou mais variáveis de entrada associadas a um conjunto fuzzy para uma ou mais variáveis de saída, também associadas a um conjunto fuzzy, de um dado sistema.

Uma proposição fuzzy pode ser simples ou composta, dependendo do comportamento da parte antecedente da regra, ou seja, quando a parte antecedente do tipo $x \in A$ a proposição é considerada simples porém quando é formada pela composição de proposições simples com os conectivos “e”, “ou” e “não”, como por exemplo $x \in A$ ou $x \in B$, é uma proposição considerada composta (Anjos, 2008). Assim, podem ser consideradas como exemplos de regras fuzzy, respectivamente simples e compostas, as regras:

$$\begin{aligned} R1 & - \text{Se } x \in A \text{ então } f(x) \in U_1. \\ R2 & - \text{Se } x \in A \text{ ou } x \in B \text{ então } f(x) \in U_2. \end{aligned}$$

Sistemas de Inferência Fuzzy

Os sistemas de inferência fuzzy são sistemas que mapeiam as entradas advindas de um conjunto de dados resultante de medições ou observações experimentais em saídas $y = f(x)$, onde x é a entrada, y a saída do sistema de inferência fuzzy e f uma representação quantitativa do mapeamento (Benini, 2007).

Um sistema de inferência fuzzy possui quatro componentes principais (Figura 15) (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008):

- ✓ *Fuzzificador*, que modela matematicamente as informações das variáveis de entrada por meio de conjuntos fuzzy. É neste módulo que se mostra a grande importância do especialista no processo a ser analisado, pois a cada variável de entrada devem ser atribuídos termos linguísticos que representem o estado desta variável e a cada termo linguístico deve ser associado uma função de pertinência;
- ✓ *Base de regras*, constituída por uma base de regras, que pode ser considerada o núcleo do sistema, onde estão as declarações linguísticas do tipo “se...então” e uma base de dados composta pelas variáveis linguísticas, as definições dos respectivos universos de discursos e suas funções de pertinência.
- ✓ *Método de inferência*, no qual se define quais são os conectivos lógicos usados para estabelecer a relação fuzzy que modela a base de regras. É deste método que depende o sucesso do sistema já que ele fornecerá a saída fuzzy a partir de cada entrada fuzzy;
- ✓ *Defuzzificador*, converte a saída fuzzy para um valor numérico.

Existem, basicamente, dois tipos de sistemas de inferência fuzzy que podem ser implementados na lógica fuzzy: o tipo Mamdani e o tipo Takagi-Sugeno. Estes dois tipos variam no modo em que as saídas são determinadas. A estrutura dos modelos Takagi-Sugeno é intrinsecamente adequada para a representação de sistemas dinâmicos complexos, largamente utilizado em engenharia de controle fuzzy. O sistema Mamdani combina os graus de pertinência referentes a cada um dos valores de entrada, através do operador mínimo e agrega as regras através do operador máximo, com aplicação em sistemas especialistas na tomada de decisão (Amendola et al. 2005).

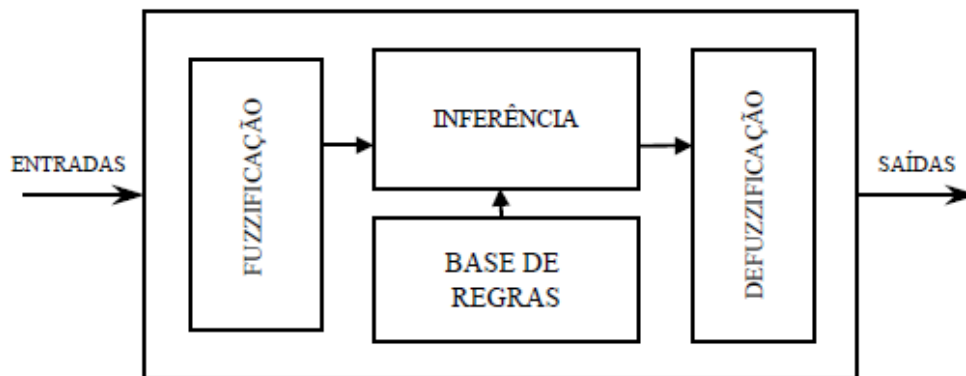


Figura 15. Estrutura geral dos sistemas de inferência Fuzzy

Defuzzificação

Tanto os modelos lingüísticos tipo Mamdani quanto o tipo Takagi-Sugeno fornecem como saída para o sistema um conjunto fuzzy. Em algumas situações os resultados podem ser analisados como conjuntos fuzzy, porém muitas vezes é necessário que essas saídas sejam apresentadas de forma numérica. Esse objetivo é alcançado pela defuzzificação do sistema, que consiste na determinação de um valor de estimação não fuzzy. Existem muitas técnicas de realização desse processo e entre as mais utilizadas estão o método da média dos máximos, o método do centro de área (centróide) e o método das alturas (Amendola et al. 2005; Anjos, 2008; Vasconcelos et al. 2010).

O método das médias dos máximos calcula a média de todos os valores de saída que tenham os maiores graus de pertinência. Esse método fornece como resultado o ponto médio do intervalo que contém o maior grau de pertinência (Figura 16).

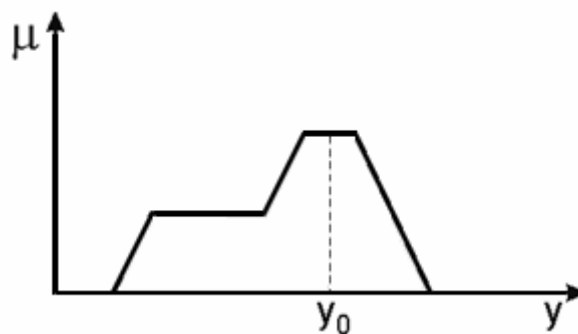


Figura 16. Método de defuzzificação médias dos máximos, Ortega, 2001 *apud* Anjos, 2008.

O método do Centro de Área é a técnica de defuzzificação mais comumente utilizada (Ortega, 2001 *apud* Anjos, 2008; Vasconcelos et al. 2010) e pode ser compreendida como uma média ponderada onde $\mu_A(x)$ funciona como o peso do valor x . A figura 17 exemplifica o resultado obtido com o método de defuzzificação do Centro de Área.

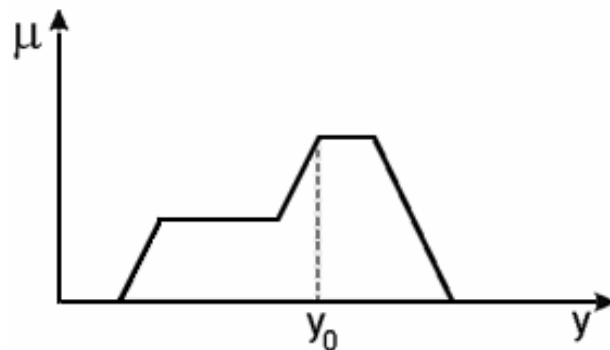


Figura 17. Método de defuzzificação Centro de Área, Ortega, 2001 *apud* Anjos, 2008.

O método das alturas pode ser entendido como uma aproximação do método do Centro de Área e é realizado em duas etapas distintas. A primeira etapa converte a função de pertinência utilizada e os consequentes das regras para a teoria clássica, obtendo o centro de gravidade respectivo, e posteriormente aplica a defuzzificação do centróide para as regras com os consequentes clássicos, o que facilita os cálculos e reduz o custo computacional (Anjos, 2008). A Figura 18 ilustra um exemplo desse método de defuzzificação.

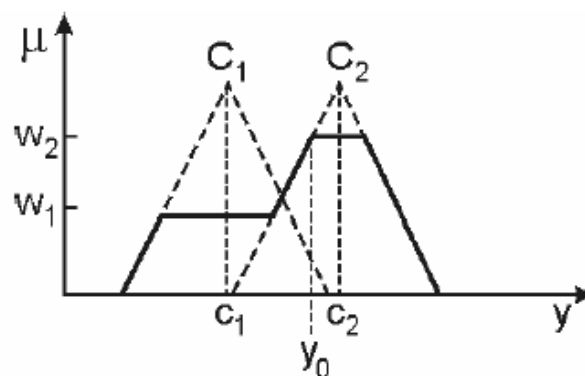


Figura 18. Método de defuzzificação método das alturas, Ortega, 2001 *apud* Anjos, 2008.

Objetivo Geral

Desenvolver e validar um modelo de avaliação de variáveis ambientais relacionadas com a distribuição espacial do *Trypanosoma cruzi* e suas DTUs e com o risco de ocorrência de surtos de doença de Chagas aguda (DCA) para Amazônia.

Objetivos específicos

- I. Diagnosticar e mapear a distribuição do Z3 de *T. cruzi* (DTUs TcIII e TcIV) extra Amazônia;
- II. Estimar e comparar a prevalência da infecção natural por *T. cruzi* em mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos em uma área de casos recorrentes de DCA, através de exames sorológicos e parasitológicos;
- III. Avaliar o impacto da perda da diversidade de espécies de pequenos mamíferos sobre o ciclo silvestre de transmissão de *T. cruzi*;
- IV. Validar o uso de cães como sentinela do ciclo de transmissão de *T. cruzi* em área de ocupação humana;
- V. Construir mapas fuzzy que indiquem uma superfície de decisão para classificar em áreas de maior ou menor risco de transmissão por *T. cruzi*.

Resultados

A tese inclui três artigos:

Capítulo 1. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Veterinary Parasitology* 165 (2009) 19–24: (doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.002);

Capítulo 2. *Trypanosoma cruzi* among wild mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil): risk of transmission to domestic mammals and humans. *In press: Veterinary Parasitology* (2012) (doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.028);

Capítulo 3. Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk. (2012) *PLoS Negl Trop Dis* 6(5): e1647: (doi:10.1371/journal.pntd.0001647);

Capítulo 4. Resultados referente ao modelo fuzzy de inferência espacial na determinação das variáveis e áreas de maior risco de DCA em Abaetetuba e Belém/Pará, como uma nova ferramenta no diagnóstico ambiental no suporte na tomada de decisão na vigilância epidemiológica de DCA. Manuscrito em fase de redação.

Outras publicações:

Anexo 1. Araújo, C.A.C., Waniek, P.J., **XAVIER, S.C.C.**, Jansen, A.M. (2011). Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Experimental Parasitology*, 127: 308-312.

Anexo 2. Fabiana Lopes Rocha, André Luiz Rodrigues Roque, Ricardo Corassa Arrais, Jean Pierre Santos, Valdirene dos Santos Lima, **Samanta Cristina das Chagas Xavier**, Pedro Cordeir-Estrela, Paulo Sérgio D'andrea and Ana Maria Jansen (2012). *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology* doi:10.1017/S0031182012001539

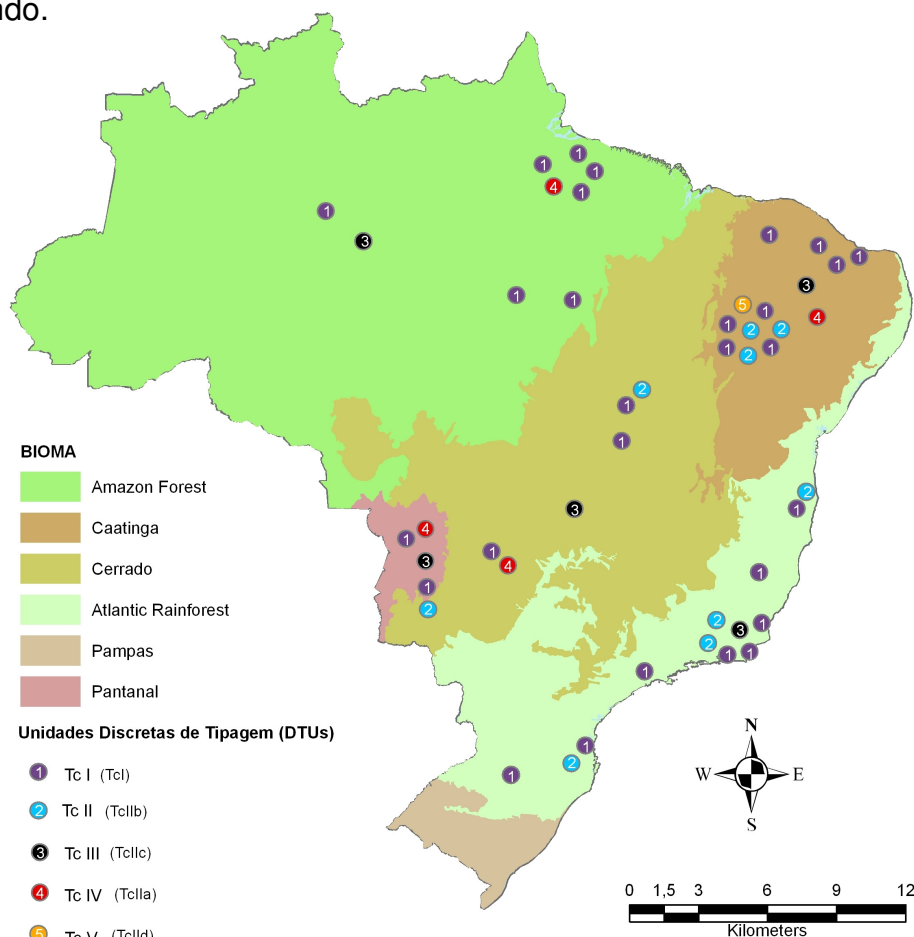
Artigo 1. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes

Cristiane Varella Lisboa, **Samanta Cristina das Chagas Xavier**, Heitor Miraglia Herrera, Ana Maria Jansen

Publicado na Veterinary Parasitology (2009) 165 19–24.

doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.002:

Neste artigo focamos em mapear a distribuição das DTUs TcIII e TcIV do *Trypanosoma cruzi* em diferentes biomas brasileiros e hospedeiros com objetivo de conhecer sua distribuição geográfica e identificar em quais hospedeiros estão circulando.



Mapa da distribuição geográfica das Unidades Discretas de Tipagem do (DTUs) do *Trypanosoma cruzi* no ciclo silvestre por biomas no Brasil.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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

The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes

Cristiane Varella Lisboa, Samanta Cristina das Chagas Xavier, Heitor Miraglia Herrera, Ana Maria Jansen*

Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 210400-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2009

Received in revised form 25 May 2009

Accepted 2 July 2009

Keywords:

Trypanosoma cruzi

TCI, TCII and Z3 subpopulation

Wild hosts

ABSTRACT

Two main genotypes in *Trypanosoma cruzi* subpopulations can be distinguished by PCR amplification of sequences from the mini-exon gene non-transcribed spacer, respectively, *T. cruzi* I (TCI) and *T. cruzi* II (TCII). This technique is also capable of distinguishing a third assemblage of subpopulations that do not fit in these genotypes and that remain known as zymodeme Z3 (Z3). The distribution pattern as well as the mammalian host range of this latter *T. cruzi* sublineage still remains unclear. Thus, the intention of our study was to increase the information regarding these aspects. The mini-exon analysis of *T. cruzi* isolates obtained from sylvatic animals in the Amazon Forest, Atlantic Rainforest, Caatinga and Pantanal showed that prevalence of the Z3 subpopulation in nature was low (15 out of 225 isolates, corresponding to 7%). A higher prevalence of Z3 was observed in the Caatinga (15%) and the Pantanal (12%). Infection by Z3 was observed in mammalian hosts included in Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Rodentia and Xernathra. The *T. cruzi* Z3 subpopulation was observed also in mixed infections (33%) with TCI ($n = 2$) and TCII ($n = 3$). These results demonstrate that *T. cruzi* Z3 displays a wider distribution and host range than formerly understood as it has been demonstrated to be able infect species included in five orders of mammalian host species dispersed through all forest strata of the four Brazilian biomes evaluated.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, a taxon composed by clonal subpopulations, infects hundreds of mammalian host species included in eight mammalian orders (Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Perissodactyla, Primates, Rodentia and Xenarthra). Also, this eclectic parasite is able to infect almost all tissues of its hosts and to establish transmission cycles in the wild that may or not overlap even if a same forest fragment or forest strata is considered (Pinho et al., 2000; Lisboa et al., 2006). Since the time of the description of *T. cruzi* and Chagas disease, many

studies have been trying to correlate the distinct subpopulations of the parasite with mammalian or insect hosts species, human disease outcome and/or geographical distribution, but, until now, these questions still remain open. The seminal biochemical studies based on the electrophoretic profile of isozymes have defined three zymodemes for *T. cruzi*. In Brazil, Z1 and Z2 were associated, respectively, with the sylvatic and the domestic transmission cycles. The third group, zymodeme Z3, was described as being predominant in the Amazon region (Miles et al., 1978, 1981). Zymodeme Z1 and Z2 were later recognized as corresponding to two phylogenetic genotypes, respectively, *T. cruzi* I (TCI) and *T. cruzi* II (TCII) by PCR amplification of sequences from the mini-exon gene non-transcribed spacer (Souto et al., 1996). Afterwards analyses based on RADP and MLEE showed that the TCII

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2598 4324; fax: +55 21 2560 6572.
E-mail address: jansen@ioc.fiocruz.br (A.M. Jansen).

genotype presents a high genetic diversity and should be divided into five robust branches (IIa–IIe). However, by DNA sequence analysis, the TCI genotype consists of a single relatively homogeneous clade, whereas TCII emerges as two or three distinct phylogenetic clades (equivalent to IIa–IIc), with two hybrid lineages (IId, IIe) that have haplotypes split across the IIb and IIc clades (Brisse et al., 2000).

The genetic position of the third assemblage remained as Z3 (Miles et al., 1978) and is still under debate (Anonymous, 1999). Thus this zymodeme was already recognized as an independent genotype (TCIII) (de Freitas et al., 2006; Pedroso et al., 2007) in contrast to others that considered Z3 isolates as included in the TCI genotype (Miles et al., 1981; Fernandes et al., 1998a; Kawashita et al., 2001; Santos et al., 2002) or close to TCII genotype (IIa and IIc) (Brisse et al., 2000; Machado and Ayala, 2001; Araújo et al., 2002).

Here, the PCR amplification of the mini-exon gene non-transcribed spacer was employed for the characterization of isolates of *T. cruzi* derived from wild hosts focusing the distribution of Z3.

Previous studies showed that *T. cruzi* subpopulations are not equally distributed in nature. Genotype TCI displays the wider distribution and was detected in wild and synanthropic mammals in all biomes and in all countries of the occurrence of the parasite. The TCI genotype is also involved in human infection from the Amazon region northwards. In the southern cone countries *T. cruzi* I is described as associated with the sylvatic transmission cycle while TCII is considered to be associated to human cases of Chagas disease, with intradomiciliar transmission. Reports on TCII infected wild mammals are less numerous, however, this genotype also displays a significant wild mammalian host range in spite of being transmitted in more confined but also widely distributed transmission cycles (Briones et al., 1999; Pung et al., 1998; Pinho et al., 2000; Lisboa et al., 2004; Herrera et al., 2005, 2008).

Concerning the distribution and ecology of the *T. cruzi* Z3 sublineage, the data are scarce. This genotype has been associated mainly with armadillos and, in Brazil, to the Amazon basin area (Miles et al., 1981). The recently described two sub clusters in Z3 isolates (Z3-A and Z3-B) of the Brazilian Amazon indicate how much remains to be clarified concerning this *T. cruzi* group (Mendonça et al., 2002). The presence of Z3 in areas other than the Amazon basin was reported for the first time in *Triatoma brasiliensis* captured in Caatinga and in *Triatoma vitticeps*

collected in the Atlantic Rainforest (Xavier et al., 2007; Santos-Mallet et al., 2008). Besides this triatomine species also *Rhodnius prolixus*, *R. brethesi*, *T. infestans* and *Panstrongylus geniculatus* were found infected with zymodeme 3 (Z3) *T. cruzi*, *Dasybus novencinctus* and *Monodelphis breviceaudata* were described as hosts in the Brazilian Amazon Basin. In other countries such as Colombia Z3 was observed in *Proechimys semispinosus*, *Dasybus* sp. in addition to the synanthropic marsupial *Didelphis marsupialis*. These findings led authors to propose an association of Z3 with terrestrial and burrowing mammals (Miles et al., 1981; Póvoa et al., 1984; Valente et al., 2009; Gaunt and Miles, 2000; Cuervo et al., 2002; Santos et al., 2002). In addition to wild mammals Z3 was also described infecting domestic dogs in Argentina (Cardinal et al., 2008).

Studies including a representative sample of hosts and habitats in order to recognize the distribution of Z3 in the wild are missing. Thus, here the main purpose was to contribute with the knowledge of wild hosts and the distribution of the *T. cruzi* subpopulation Z3 in Brazilian biomes.

The data presented combine results obtained over the last years combined with new results obtained more recently in our lab.

2. Materials and methods

2.1. Examined mammals

A total of 2292 specimens of sylvatic mammals included in six orders (Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Rodentia, Xernathra) and one triatomine family (Reduviidae) were sampled between 1995 and 2007 in four geographic biomes: Amazon Forest, Atlantic Rainforest, Caatinga and Pantanal (Table 1).

Wild mammals were non-injurious captured in the field in different primary and secondary forest fragments with Sherman and Tomahawk traps baited with a universal mixture or with bananas in the specific case of tamarins and marmosets. Bats and armadillos were captured with a special net and singular trap, respectively. Captive primates were captured in cages with appropriate nets. All animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketalar[®] – Parke – Davis, New Jersey, USA) or tiletamine and zolazepan hydrochloride (Zoletil 50 – Virbac, São Paulo, Brazil) for blood collection. Triatomines were collected in peridomicile and domiciles in Atlantic Rainforest and Caatinga.

Table 1
Trypanosoma cruzi in wild hosts from Brazilian biomes: number of examined specimens in each biome between 1995 and 2007.

Biome	Host orders (number of species)	Examined hosts
Amazon Forest	Chiroptera (7), Didelphimorphia (15), Rodentia (41), Primates (99) and Xernathra (1).	163
Atlantic Rainforest	Carnivora (1), Chiroptera (6), Didelphimorphia (200), Rodentia (133), Primates (850), Xernathra (3) and Hemiptera ^a (16)	1209
Caatinga	Didelphimorphia (55), Rodentia (310), Xernathra (3) and Hemiptera ^a (3)	371
Pantanal	Artiodactyla (30), Carnivora (72), Chiroptera (41), Didelphimorphia (70), Rodentia (305) and Xernathra (31)	549
Total	8	2292

^a Insecta (Family Reduviidae).

All animal captures were in accordance with the licenses obtained from the Brazilian Government Institute for Wildlife and Natural Resources Care (IBAMA). Biosecurity techniques and individual safety equipment were used in all procedures involving animals and biological samples (CEUA/FIOCRUZ N° L-017/05).

2.2. *Trypanosoma isolates*

Two blood smears from each animal were Giemsa-stained and examined for patent parasitemia.

Approximately 0.3 ml of whole blood obtained by femoral or cardiac puncture (in the case of bats and rodents) from each mammal under anesthesia was placed on NNN medium (Novy, McNeal and Nicolle), covered with an overlay of LIT (liver infusion tryptose) containing 10% fetal calf serum and 140 µg/ml of gentamycin sulfate. Isolations were originally carried out for 1 cycle in NNN/LIT hemocultures and cryopreserved upon reaching a concentration of 10⁶ parasites/ml overlay until use for this study.

2.3. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* genotypes

Epimastigote forms collected from cultures at the end of the log phase were centrifuged at 4000 × g. Parasites were washed three times with PBS, resuspended in 1 ml TE (10 mM Tris–HCl, pH 8.0/10 mM EDTA, pH 8.0) and incubated at 56 °C for 2 h with 100 µg/ml of proteinase K and 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate). The DNA of the lysed cells was extracted with phenol: chloroform (1:1) and precipitated after the addition of sodium acetate and ethanol (Sambrook et al., 1989). Differential amplification of part of the non-transcribed spacer of the mini-exon gene could be achieved using a pool of five oligonucleotides for the PCR. Three oligonucleotides derived from a hypervariable spot of the mini-exon repeat: TCI: 5'ACACTTCTGTGGCGCTGATCG3'; TCII: 5'TTGCTCGCACACTCGGCTGCA T3' and Z3: 5'CCGCGWACAACCCCTMATAAAAATG3' and an oligonucleotide from a specific region of the *T. rangeli* non-transcribed spacer (TR: 5'CCTATTGTGATCCCCA-TCTTCG3') were used as upstream primers. A common downstream oligonucleotide, corresponding to sequences present in the most conserved region of the mini-exon gene (ME: 5'TACCAATATAGTACAGAAACTG3') was used as the opposing primer in the multiplex reaction. The PCR conditions used in this study were described elsewhere (Fernandes et al., 2001). The amplification products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and UV visualization. Four reference strains were used as controls: F (*T. cruzi* I), Y (*T. cruzi* II), Rb III isolated from *R. brethesi* (*T. cruzi* isolate in the Amazon region typed as Z3) and San Augustin (*T. rangeli*).

3. Results

The results revealed three main features concerning the dispersion and host range of Zymodeme 3 (Z3) in nature:

- (i) The low number of isolates of this lineage obtained from free ranging wild hosts in comparison to TCI and

Table 2

Trypanosoma cruzi in wild hosts from Brazilian biomes: infection by Zymodeme Z3 in each biome between 1995 and 2007.

Brazilian biome	<i>Trypanosoma cruzi</i> /examined host	Z3 isolates/ <i>Trypanosoma cruzi</i> isolates ^a
Amazon Forest	23/163 (13%)	1/23 (5%)
Atlantic Rainforest	113/1209 (9%)	2/113 (2%)
Caatinga	40/371 (11%)	6/40 (15%)
Pantanal	48/549 (9%)	6/48 (12%)
Total	224/2292 (10%)	15/224 (7%)

^a Only hemoculture was used as diagnostic method.

- (ii) Its broad dispersion throughout the Brazilian biomes as demonstrated by the observation of Z3 infecting hosts in the Amazon basin Forest, Atlantic Rainforest, Caatinga and Pantanal, independent of local mammalian and vectorial fauna composition; with a higher prevalence observed in the semi-arid Caatinga (15%) and Pantanal region (12%), two very different ecogeographic biomes (Table 2).
- (iii) The broad range of mammalian hosts that this lineage may infect in single or mixed infection with TCI and TCII. Indeed, despite the low isolation rate of Z3 from free ranging hosts, it was observed that this subpopulation infects an expressive number of host species included in Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Marsupialia, Rodentia and Xernathra (Table 3).

In the Caatinga, Z3 was found infecting armadillo (*D. novencinctus*) and a caviomorph rodent (*Thrichomys laurentius*) while in the Pantanal armadillo (*Euphractus sexancinctus*), bats (*Phyllostomus hastatus*, *Artibeus jamaicensis*) and coatis (*Nasua nasua*) were found infected by this genetic lineage. In the Amazon forest Z3 was observed infecting one armadillo (*D. novencinctus*). In the Atlantic Rainforest, where a higher diversity of mammalian hosts species were examined, Z3 was found infecting only one opossum (*Didelphis aurita*) and one carnivore, the grison (*Galictis vittata*) (Table 3).

Zymodeme 3 demonstrated to occur in nature in single (10/15) or mixed infections (5/15) with TCI (2/5) or TCII (3/5). A higher prevalence of single Z3 infection was observed in the Caatinga (5/6), while in the Pantanal we noticed a higher number of mixed infections (3/6) (Table 3). Mixed infections were more usual in animals with eclectic alimentary habits such as bats (Chiroptera), coatis, grison and caviomorph rodents (Rodentia) (Table 3).

Regarding infection in vectors, Zymodeme 3 *T. cruzi* was recognized in all three exemplars of *T. brasiliensis* collected in the Caatinga peridomicile and domicile areas, while no Z3 could be identified in the exemplars collected in the Atlantic Rainforest (Table 4).

4. Discussion

Here, a broad host range of the *T. cruzi* subpopulation Z3 distributed among different Brazilian biomes was verified. In fact, the presented data indicate that Z3 has a broad

Table 3
Trypanosoma cruzi in wild hosts from Brazilian biomes: hosts infected.

Biome	Order	Species	Area	Typing	Authors
Amazon Forest	Xernathra	<i>Dasybus novencinctus</i>	Cachoeira do Arari, PA	Z3	Roque et al. (2008)
Atlantic Forest	Didelphimorphia	<i>Didelphis aurita</i>	Piraí, RJ	Z3	This work
	Carnivora	<i>Galictis vittata</i>	Sumidoro, RJ	TCII/Z3	This work
Caatinga	Rodentia	<i>Thrichomys laurentius</i>	Jurubeba, PI ^a	Z3	This work
	Rodentia	<i>Thrichomys laurentius</i>	Pedra Solta, PI	TCI/Z3	Herrera et al. (2005)
	Hemiptera	<i>Triatoma brasiliensis</i>	João Costa, PI	Z3	This work
	Hemiptera	<i>Triatoma brasiliensis</i>	João Costa, PI	Z3	This work
	Xernathra	<i>Dasybus novencinctus</i>	Curaça, BA	Z3	This work
	Hemiptera	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Curaça, BA	Z3	This work
Pantanal	Chiroptera	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Nhumirin Farm, MS	TCII/Z3	Lisboa et al. (2008)
	Chiroptera	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Nhumirin Farm, MS	TCII/Z3	Lisboa et al. (2008)
	Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	Nhumirin Farm, MS	Z3	Herrera et al. (2008)
	Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	Nhumirin Farm, MS	TCI/Z3	Herrera et al. (2008)
	Xernathra	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Nhumirin Farm, MS	Z3	This work
	Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	Alegria Farm, MS	Z3	Herrera et al. (2008)
Total	6			15	

^a Jurubeba displays a Cerrado/Caatinga transition phytogeography area.

distribution in Brazil, in four extremely distinct ecogeographic biomes: Amazon forest, Atlantic Rainforest, Caatinga, and Pantanal. Indeed, subpopulation Z3 was shown to be much more dispersed than formerly believed (limited only from the Amazon basin) (Miles et al., 1978; Póvoa et al., 1984; Valente et al., 2009), as shown in Fig. 1.

Moreover, in spite of its demonstrated wide host range, Z3 represented only 7% of all isolates obtained. This feature, apart from possibly biased sampling, is probably the cause of the previously described limited distribution and narrow host range of this genotype. Low recovery rates of *T. cruzi* due to hemocultures is a common and known feature in chronic infections of humans and animals, but the recovery of Z3 isolates was significantly lower in comparison to the two other *T. cruzi* genotypes. Thus, two possible and not mutually excludent explanations could be considered: (i) Z3 infections in free ranging wild mammals tend to result in very low parasitemias, more rarely detected by means of hemocultures than for hosts infected with the other two genotypes of the parasite; (ii) Z3 is maintained in nature in extremely narrow and focal transmission cycles.

Assuming that the first hypothesis is correct, it demonstrates a successful transmission and maintenance strategy of Z3 in nature in spite of the low prevalence of high parasitemias (detectable by hemocultures), in fact, the occurrence of this *T. cruzi* subpopulation in a great range of host species in so diverse biomes and habitats,

that include human dwellings and peridomiciliar areas, indicate efficient transmission strategies. If the second hypothesis is correct it is tempting to wonder about a possible future expansion or reduction of the transmission in nature of this genotype. Whatever happens, the biological versatility of this *T. cruzi* subgroup is demonstrated by its occurrence in mammals collected in biomes that display distinct and even contrasting characteristics, as is the case of the Amazon forest, Atlantic Rainforest, Caatinga, and Pantanal.

Table 2 shows that only one Z3 isolate was obtained from the 163 mammals examined in the Amazon region. This low prevalence of the Z3 isolation success was unexpected since the *T. cruzi* Z3 subpopulation has classically been associated to this region (Miles et al., 1981; Póvoa et al., 1984; Coura et al., 2002).

The presented data do not support an association of the Z3 subpopulation with a given mammal species or geographical region, given that the Z3 hosts are included in five mammalian orders exploiting all forest strata (arboreous, intermediary, ground and underground).

The finding of Z3 *T. cruzi* in a carnivore, the grison *G. vittata*, and the recent description in *T. vitticeps* in the Atlantic forest of Rio de Janeiro confirm the wide distribution and host eclectism of Z3. It is worth mentioning that *T. vitticeps* was considering an important vector of *T. cruzi* in the Atlantic forest (Santos-Mallet et al., 2008). In this biome mixed infection by TCII and Z3 was observed in grison suggesting that this isolate may occur due to the eclectic alimentary habits of host.

A higher prevalence of Z3 isolates was observed in the Caatinga (semi-arid, with low biodiversity) and the Pantanal (humid with high biodiversity). In the Caatinga the caviomorph rodent (*T. laurentius*), the marsupial species (*D. marsupialis*) and vector species *T. brasiliensis* were found harboring single and mixed infections by TCI, TCII and Z3 subpopulation (Herrera et al., 2005). In the Pantanal, the coati (*N. nasua*) showed to be an important reservoir of *T. cruzi* since these hosts also demonstrated single or mixed infection by the Z3 *T. cruzi* subpopulation

Table 4
Trypanosoma cruzi in wild hosts from Brazilian biomes: zymodeme Z3 in vectors.

Brazilian biome	<i>Trypanosoma cruzi</i> /examined vectors	Z3 isolates/ <i>Trypanosoma cruzi</i> isolates
Amazon Forest	0/0	0/0
Atlantic Rainforest	10/16	0/10
Caatinga	3/3	3/3
Pantanal	0/0	0/0
Total	13/16	3/13

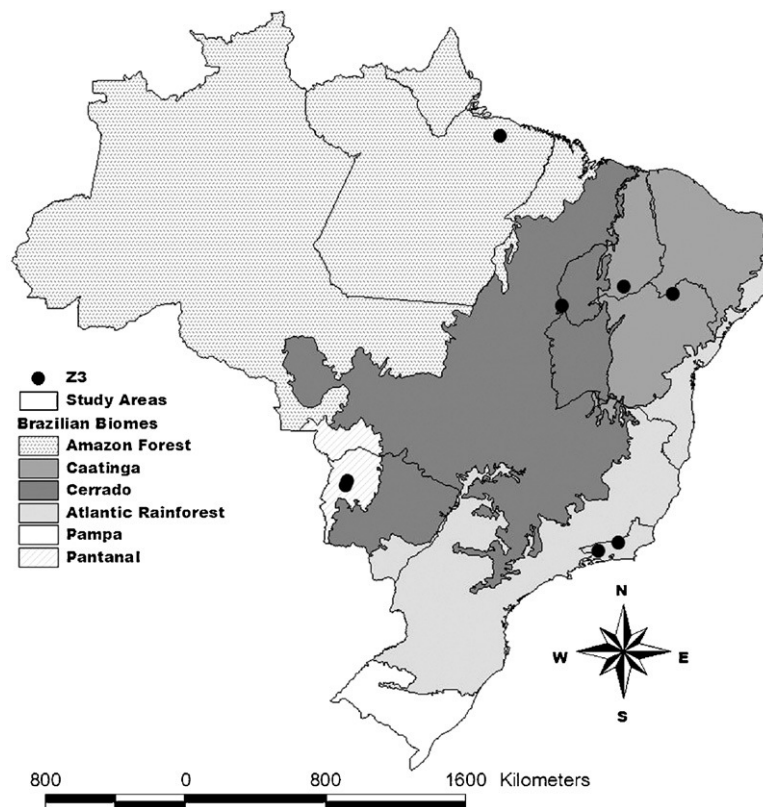


Fig. 1. Dispersion of zymodeme 3 (Z3) of *Trypanosoma cruzi* in wild host from Brazilian biomes.

(Herrera et al., 2008). Factors such as higher exposition of this taxon to Z3 in some habitats or selective forces exerted by this mammalian species on the subpopulations of *T. cruzi* should not be ruled out. Bats demonstrated to be tolerant *T. cruzi* hosts since besides Z3 they harbored combinations of mixed infections of *T. cruzi* genotypes (Lisboa et al., 2008). Coatis and grisons are predator mammals, located on the middle of food chain and therefore probably frequently infects by the oral route. Coatis infected with *T. cruzi* are frequently observed (Herrera et al., 2008), but this is the first description of a grison found infected with *T. cruzi*. However, marsupials and rodents are common hosts of any *T. cruzi* subpopulations in the majority of Brazilian biomes (Pinho et al., 2000; Lisboa et al., 2004).

Field samples must always consider full biodiversity of its fauna and their interaction in the field fragment. Some animals are more easily captured than the others such as armadillos, marsupials and rodents, but they may not necessarily represent all species present in the area. In fact, each ecosystem must be considered as unique and all biotic and abiotic aspects that are involved must be considered.

The present finding of the *T. cruzi* Z3 subpopulation infecting different host taxa (armadillos, bats, carnivora, marsupials, rodents and triatomines), each species with its peculiar behaviors in the very different ecological niches observed in distinct Brazilian biomes, amplifies the information concerning dispersion of this subpopulation

in its natural environment and suggest that the *T. cruzi* Z3 subpopulation does not have any specific association with specific wild mammalian species/habitats or restricted biomes.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to Dr. Vera Bongertz for her critical reading and revision of the manuscript. We wish to show gratitude to Ana Paula Pinho and Ana Cláudia Machado Duarte for their molecular characterization of some *Trypanosoma cruzi* isolates. We thank Paulo Sergio D'Andrea and Vanderson Vaz to capture carnivora and rodents species in Atlantic Rainforest of Rio de Janeiro. The Financial support has been provided at various times by POM/PAPES – FIOCRUZ and CNPq. C.V. Lisboa is a FAPERJ Researcher Visitant (FIOCRUZ/FAPERJ).

References

- Anonymous, 1999. Recommendations from an International Symposium to commemorate the 90th Anniversary of the Discovery of Chagas Disease, RJ, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94, 429–432.
- Araújo, C.A., Mello, C.B., Jansen, A.M., 2002. *Trypanosoma cruzi* I and *Trypanosoma cruzi* II: recognition of sugar structures by *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin) lectin. J. Parasitol. 88, 582–586.
- Briones, M.R.S., Souto, R.P., Stolf, B.S., 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, 219–232.

- Brise, S., Barnabe, C., Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* 30, 35–44.
- Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., marcet, P.L., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schiiman, A.G., 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural north-western Argentina. *Int. J. Parasitol.* 38, 1533–1543.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., Miles, M.A., 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 4, 171–176.
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N., Fernandes, O., 2002. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97, 877–880.
- de Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2, e24.
- Fernandes, O., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Morel, C.M., Zingales, B., Campbell, D., Jansen, A.M., 1998a. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the min-exon gene. *Parasitology* 118, 161–166.
- Fernandes, O., Santos, S.S., Cupolillo, E., Mendonça, B., Derre, R., Junqueira, A.C., Santos, L.C., Sturm, N.R., Naiff, R.D., Barret, T.V., Campbell, D.A., Coura, J.R., 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. S. Trop. Med. Hyg.* 95, 97–99.
- Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 557–565.
- Herrera, L., D'andrea, P.S., Xavier, S.C., Mangia, R.H., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park Serra da Capivara and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 379–388.
- Herrera, H.M., Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Olifiersc, N., Bianchib, R.C., Rocha, F.L., Mourão, G.M., Jansen, A.M., 2008. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 1133–1139.
- Kawashita, S.Y., Sanson, G.F., Fernandes, O., Zingales, B., Briones, M.R., 2001. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol. Biol. Evol.* 218, 2250–2259.
- Lisboa, C.V., Mangia, R.H., De Lima, N.R., Martins, A., Dietz, J., Baker, A.J., Ramon-Miranda, C.R., Ferreira, L.F., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2004. Distinct patterns of *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* in distinct Atlantic coastal rainforest fragments in Rio de Janeiro-Brazil. *Parasitology* 129, 703–711.
- Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Monteiro, R.V., Jansen, A.M., 2006. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp. Parasitol.* 116, 150–155.
- Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Herrera, H.M., Gerhardt, M., Cupolillo, E., Jansen, A.M., 2008. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet. Parasitol.* 156, 314–318.
- Machado, C.A., Ayala, F.J., 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7396–7401.
- Mendonça, M.B., Nehme, N.S., Santos, S.S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Coura, J.R., Zingales, B., Fernandes, O., 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 124, 177–184.
- Miles, M.A., Souza, A., Póvoa, M., Shaw, J.J., Jainzon, R., Toyé, P.J., 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brasil. *Nature* 27, 819–921.
- Miles, M.A., Póvoa, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J., Ketteridge, D.S., 1981. Chagas's disease in the Amazon Basin: li. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 667–674.
- Pedroso, A., Cupolillo, E., Zingales, B., 2007. *Trypanosoma cruzi*: exploring the nuclear genome of zymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism. *Exp. Parasitol.* 116, 71–76.
- Pinho, A.P., Cupolillo, E., Mangia, R.H., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2000. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans. R. S. Trop. Med. Hyg.* 94, 509–514.
- Póvoa, M.M., de Souza, A.A., Naiff, R.D., Arias, J.R., Naiff, M.F., Biancardi, C.B., Miles, M.A., 1984. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 479–487.
- Pung, O.J., Spratt, J., Clark, C.G., Norton, T.M., Carter, J., 1998. *Trypanosoma cruzi* infection of free-ranging lion-tailed macaques (*Macaca silenus*) and ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) on St. Catherine's Island, Georgia, USA. *J. Zoo Wildl. Med.* 29, 25–30.
- Roque, A.L., Xavier, S.C., da Rocha, M.G., Duarte, A.C., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2008. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 742–749.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos-Mallet, J.R., Silva, C.S., Gomes, S.A.O., Oliveira, D.L., Santos, C.L., Sousa, D.M., Pinheiro, N.L., Junquiera, A.C.V., Gonçalves, T.C.M., 2008. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol. Res.* 103, 1041–1045.
- Santos, S.S., Cupolillo, E., Junqueira, A., Coura, J.R., Jansen, A., Sturm, N.R., Campbell, D.A., Fernandes, O., 2002. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96, 755–764.
- Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152.
- Valente, S.A., da Costa, V.V., das Neves Pinto, A.Y., de Jesus, B.C.M., dos Santos, M.P., Miranda, C.O., Cuervo, P., Fernandes, O., 2009. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 291–297.
- Xavier, S.C., Vaz, V.C., D'Andrea, P.S., Herrera, L., Emperaire, L., Alves, J.R., Fernandes, O., Ferreira, L.F., Jansen, A.M., 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, 119–128.

Artigo 2. *Trypanosoma cruzi* among wild mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil): risk of transmission to domestic mammals and humans.

André Luiz R. Roque, **Samanta C. C. Xavier**, Marconny Gerhardt , Miguel F. O. Silva, Valdirene S. Lima, Paulo S. D'Andrea, Ana M. Jansen

In press: Veterinary Parasitology (26/11/2012):
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.028>

Neste artigo nós analisamos três perfis eco-epidemiológico do ciclo de transmissão de *T. cruzi* em mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos no município de Abaetetuba/Pará, onde são registrados casos recorrentes de doença de Chagas Aguda (DCA).



Fonte: Rede de Notícias da Amazônia - Norte do Brasil

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Veterinary Parasitology

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

Trypanosoma cruzi among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area

André Luiz R. Roque^a, Samanta C.C. Xavier^a, Marconny Gerhardt^b, Miguel F.O. Silva^a, Valdirene S. Lima^a, Paulo S. D'Andrea^b, Ana M. Jansen^{a,*}

^a Laboratory of Trypanosomatid Biology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brazil 4365, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brazil 4365, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form

15 November 2012

Accepted 24 November 2012

Keywords:

Chagas disease

Amazon Basin

Trypanosoma cruzi

Wild mammals

Dogs

ABSTRACT

The presence of acute Chagas disease (ACD) due to oral transmission is growing and expanding in several South American countries. Within the Amazon basin, the Abaetetuba municipality has been a site of recurrent cases spanning across distinct landscapes. Because Chagas disease is primarily a zoonotic infection, we compared the enzootic *Trypanosoma cruzi* transmission cycles in three different environmental areas of Abaetetuba to better understand this new epidemiological situation. *Philander opossum* was the most abundant mammalian species collected (38% of the collected mammals) with a *T. cruzi* prevalence of 57%, as determined by hemocultures. *Didelphis marsupialis* was abundant only in the area with the higher level of environmental disturbance (approximately 42%) and did not yield detectable parasitemia. Despite similarities observed in the composition of the small mammalian fauna and the prevalence of *T. cruzi* infection among the studied areas, the potential of these hosts to infect vectors differed significantly according to the degree of land use (with prevalences of 5%, 41%, and 64% in areas A3, A1 and A2, respectively). Domestic mammals were also found to be infected, and one canine *T. cruzi* isolate was obtained. Our data demonstrated that the transmission of *T. cruzi* in the Amazon basin is far more complex than had been previously taught and showed that the probability of humans and domestic mammals coming into contact with infected bugs can vary dramatically, even within the same municipality. The exposure of dogs to *T. cruzi* infection (indicated by positive serology) was the common feature among the studied localities, stressing the importance of selecting domestic mammals as sentinels in the identification of *T. cruzi* transmission hotspots.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The classic picture of Chagas disease associated with *Triatominae infestans* in Brazil could be eliminated by routine insecticide spraying in campaigns associated with housing improvement – as was the case with the Southern

Cone Initiative (Dias, 2007). The current epidemiological profile of Chagas disease, mainly based on oral transmission represents a new challenge for public authorities because previously employed control measures are not effective against this new phenomenon. The number of cases attributed to the oral infection route has recently increased in Brazil, particularly in the Amazon Basin, which was formerly considered free of infection (Aguilar et al., 2007; Pinto et al., 2009). In fact, Chagas disease is currently considered a foodborne illness (Pereira et al., 2009).

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 1416; fax: +55 21 2562 1609.
E-mail address: jansen@ioc.fiocruz.br (A.M. Jansen).

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is a multi-host parasite that is adaptable to hundreds of mammalian species that are found at all forest strata and canopy levels. Furthermore, the species displays marked heterogeneity, and six discrete typing units (DTUs) are currently recognized among *T. cruzi* isolates (Zingales et al., 2012). These traits result in distinct occurrences of *T. cruzi* transmission in the wild that depend on such factors as the composition of local fauna and the habitat characteristics (Jansen and Roque, 2010). Thus far, TcI, TcII and TcIV are the unique DTUs known to circulate in the Amazon Basin (Póvoa et al., 1984; Marcili et al., 2009; Monteiro et al., 2010).

The Amazon Basin contains the greatest biodiversity in the world and comprises a mosaic of various faunas, habitats and biomes, in addition to culturally diverse human behavior (Betts et al., 2008). In the Brazilian Amazon region, the enzootic transmission of *T. cruzi* among wild mammals has been recognized for many decades (Deane, 1964; Lainson et al., 1979; Miles et al., 1981), but the first autochthonous case of Chagas disease was not described until 1969 (Shaw et al., 1969). This region was the source of 91% of the Brazilian cases of acute Chagas disease (ACD) reported from 2007 to 2010 (SVS-MS, 2011). Cases from the Amazon region are related to the ingestion of contaminated food (mainly açai and bacaba fruit juices), hunting activities, the harvest of babaçu and piassaba palm, and transmission within homes from invading sylvatic bugs (Coura et al., 2002; Nobrega et al., 2009; Valente et al., 2009). The common factor among all of these distinct sources is human exposure to the wild transmission cycle resulting from the activities of humans in the natural environment.

Other than Belém (the capital of Pará State), the Abaetetuba municipality in the Amazon Basin is the municipality in which the majority of Brazilian ACD cases has occurred. According to the Secretary of Health from Pará State, 119 ACD cases were confirmed in Abaetetuba between 2006 and 2011. Within Abaetetuba, Chagas disease occurs frequently as outbreaks in a seasonal and recurrent fashion and is spread across distinct localities that include peripheral districts as well as preserved areas and regions that are intermittently or continuously exploited by humans. *T. cruzi* transmission in Abaetetuba depends on the maintenance and transmission of the parasite among the local wild mammalian hosts and is consistently associated with non-domiciliated bugs. Because Chagas disease is primarily a zoonotic infection, and considering the various characteristics of the habitats in which the *T. cruzi* transmission cycle occurs in Abaetetuba, the aim of the present study was to evaluate *T. cruzi* infection in domestic (dogs and pigs) and wild mammals from three areas with different ecological landscapes and different degrees of human interference and occupation. The risk of human exposure to the wild transmission cycle of *T. cruzi* is discussed for these distinct situations.

2. Materials and methods

2.1. Study areas

The Abaetetuba municipality is located in Pará State (S01°43'05"/W48°52'57") and has an area of 1610 km² that

includes more than 45 islands. The climate is tropical-humid with annual rainfall of 2000–2500 mm. The rainy period is from January to August, whereas October and November receives the lowest rainfall. The urban section of the municipality is surrounded by peripheral regions that display secondary vegetation and agricultural areas with several remaining patches of the original Amazonian forest. The remainder of the municipality is represented by islands composed of freshwater swamp forests (nestled between diverse riverbanks) and areas with original and secondary vegetation (Amazonian forest).

Three localities were selected according to a gradient of land-use based on a governmental land-use map (Fig. 1) and were classified as follows: (A1) the Genipaúba locality, which is a more preserved area with low human occupation density; the landscape is composed mainly of typical Amazonian forest surrounded by freshwater rivers with restricted areas of environmental disturbance; (A2) the Ajuá locality, which is an area presenting sparse human habitation along a river bank; the landscape is composed of vegetation that is reminiscent of the Amazonian forest and is close to areas exploited for fruit harvest (mainly açai) and subsistence plantations along small freshwater rivers; and (A3) peripheral districts with high human occupation densities in the urban section of the municipality; the landscape is composed of regions with dense human occupation surrounded by secondary vegetation in the periphery and contains areas that were exploited for açai harvest and have been replaced by pastures and agriculture (Fig. 1). Expeditions were conducted to each locality twice: once during the wet season (April (A1 and A2) and August (A3)) and once during the dry (November (A1 and A2) and December (A3)) of 2008. Wild and domestic animals from each locality were analyzed for *T. cruzi* infection.

2.2. Sample collection

Small mammals were collected with baited Tomahawk® (Tomahawk Live Traps, Tomahawk, WI, USA) and Sherman® (H. B. Sherman Traps, Tallahassee, FL, USA) traps distributed in linear transects, with capture points established 20 m apart from each other. The traps were placed on the ground and in the understory, and the total capture efforts (combining the two expeditions for each area) yielded 1656, 1856 and 2868 traps-night for areas A1, A2, and A3, respectively. When possible, bats were also collected with special mist nets near the small-mammal capture transects from 6 pm to 10 pm. The morphological characteristics and body measurements of all captured specimens were recorded for age estimations and taxonomic identification. The taxonomic status of rodents and bats was subsequently confirmed by karyological analyses (Bonvicino et al., 2002).

With the informed consent of their owners, blood was collected from domestic mammals (dogs and pigs) by puncturing their cephalic or lateral saphenous veins using heparinized vacutainer tubes. Wild mammals were anesthetized (9:1, 10% ketamine chloridate and 2% acepromazine), and their blood was collected by cardiac puncture in dry tubes. In a field laboratory set up exclusively for this purpose, blood samples were processed as follows:

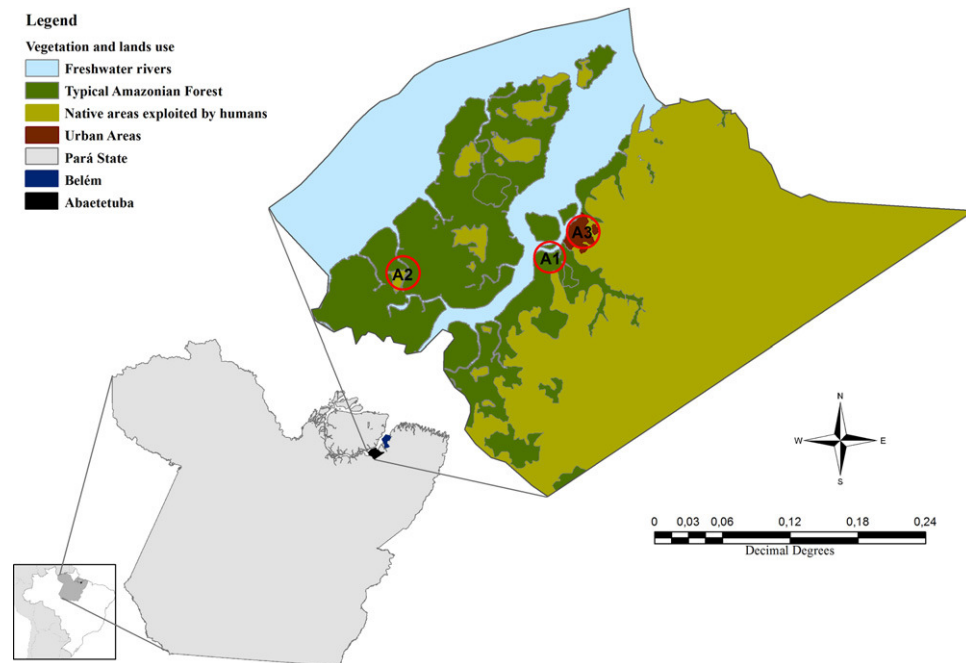


Fig. 1. Land-use map from the Abaetetuba municipality, modified from the Secretary for Strategic Projects from Pará State (SEPE/PA, <http://www.sepe.pa.gov.br/zee/shapes.asp>, accessed (07.6.11)) and illustrating the three studied areas in a gradient of environmental disturbance: Genipáuba locality (A1), Ajuai locality (A2), and peripheral districts (urban area) (A3).

(i) 0.6 ml of blood was cultured in two tubes containing Novy-Mc Neal-Nicole medium (NNN) with a liver infusion tryptose medium (LIT) overlay (hemoculture), and (ii) the remaining blood was centrifuged, and the serum (wild mammals) or plasma (dogs and pigs) that was obtained was stored at -20°C prior to analysis in serological assays. All procedures were based on protocols that were approved by the FIOCRUZ Committees of Bioethics (license 0015-07), and wild animal captures were licensed by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA/CGFAU/LIC) (license 3665-1).

2.3. Parasitological and serological diagnostic procedures

Hemocultures were analyzed every other week for three (for seronegative mammals) or five (for seropositive mammals) months. Positive hemocultures were amplified for molecular characterization and cryopreserved in the *Trypanosoma* from Sylvatic and Domestic Mammals and Vectors Collection, Oswaldo Cruz Foundation (ColTryp).

Serological diagnoses were performed using an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) performed using an adapted IFI-Chagas Bio-Manguinhos Kit[®] (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) (Camargo, 1966). *Sigmodontinae* and *Murinae* rodent sera were tested using anti-rat IgG fluorescein isothiocyanate (FITC), and domestic animals were tested using their respective anti-species IgG (Sigma[®]) conjugate. *Echimyidae* rodents and marsupials were tested with rabbit anti-*Thrichomys* spp. and anti-opossum specific intermediary antibodies, respectively, and reactions were visualized using an FITC anti-rabbit IgG conjugate (Sigma[®]). The cut-off values adopted were 1:40 for

domestic mammals and marsupials and 1:10 for rodents, as previously described (Roque et al., 2008). Dogs and marsupials were also screened for *Leishmania* spp. infection using an IFI-*Leishmania* Bio-Manguinhos Kit[®] (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) and antigens derived from a mixture of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis* parasites. Animals with serological titers for *Leishmania* spp. equal or higher the titers for *T. cruzi* were not considered to be infected by *T. cruzi* if the *T. cruzi* titers were $\leq 1:80$. Animals were considered to be infected by both *T. cruzi* and *Leishmania* sp. if the titers were $>1:80$ in both assays. For each assay, samples from experimentally infected and non-infected animals that were born in captivity were used as positive and negative controls, respectively. Animals were considered to be infected by *T. cruzi* when the serological analysis and/or hemoculture were positive.

2.4. Molecular characterization of parasites

Seventeen positive hemocultures were amplified in LIT liquid medium at 28°C for a maximum of three passages. Total genomic DNA was prepared from logarithmic phase cultures using standard phenol-chloroform protocols, as described elsewhere (Lisboa et al., 2006). Due to bacterial contamination, two positive hemocultures from A3 could not be amplified and characterized. A mini-exon multiplex PCR was performed using a reverse primer located in the conserved region of the mini-exon gene 5'TACCAATATAGTACAGAACTG 3' and the forward primers TcI 5'ACACITTTCTGTGGCGCTGATCG3', TcII 5'TTGCTCGCACACTCGGCTGATCG3', Z3 5'CCGCGWAC-AACCCCTMATAAAAATG3', *Trypanosoma rangeli*

5'CCTATTGTGATCCCATCTTCG3' (Fernandes et al., 2001). The amplified PCR products were analyzed by ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis (2%) and visualized under UV light.

2.5. Statistical analysis

The comparison of the parasitological (positive hemocultures) and serological (positive IFAT) data from the three studied regions was performed using 2×2 contingency tables and the Chi-square statistical analysis. The test was performed using the software R (Version 2.11.1, R Development Core Team, 2010) with the level of significance set at $p < 0.05$. The capture prevalence of the small mammals (not including bats and anteaters) and the ratio of *T. cruzi* infection in the Abaetetuba municipality were calculated using the absolute number of captured specimens or positive tests divided by the total number of collected mammals or examined specimens.

3. Results

3.1. *T. cruzi* maintenance in the three studied areas

The differences shown by the land-use map (Fig. 1) and locally confirmed by us was associated with the observed differences in the relative abundance of *M. murina* and *D. marsupialis*. *M. murina* was the second most-captured species in the more preserved area (A1) and represented nearly 30% of the total captured species. Despite their proximity and similarity in composition of small mammalian fauna and seropositive rate of *T. cruzi*, the three examined regions displayed distinct enzootic *T. cruzi* transmission characteristics. Although the prevalence of positive IFAT was similar ($p = 0.08$), the prevalence of mammals with detectable of *T. cruzi* parasitemia (which denotes infectivity potential) that were identified by positive hemocultures was significantly greater in A2 (64%) and A1 (41%) than in the area with more extensive environmental disturbance, namely A3 (5%) ($p < 0.001$) (Table 1). Consequently, the region with an intermediate degree of disturbance (A2) also displayed a higher prevalence of positive IFAT among domestic mammals ($p < 0.001$). Notably, A2 was also the area in which we obtained the unique *T. cruzi* isolate from dogs (Table 2).

3.2. *T. cruzi* infection in wild and synanthropic mammals

The population of small mammalian fauna collected in the three study areas was predominantly composed of marsupial species (83.6% of the collected mammals). *Philander opossum* was the main *T. cruzi* reservoir in Abaetetuba, as it was the most abundant mammalian species captured in both wet and dry seasons (38.2% of the collected mammals) and displayed the potential to infect a vector (a prevalence of 57.1% in the positive hemocultures) (Table 1). Only in A3 was *Didelphis marsupialis* the most abundant mammalian species collected (41.6%), but all of these animals yielded negative hemocultures. Even in this area, *P. opossum* was abundant (29.1% of the collected mammals), with 71.4% serologically positive to *T. cruzi*, and one positive hemoculture. Among the other captured species, only *Marmosa*

murina in A1 was relatively abundant; however, despite infection of this species with *T. cruzi* (66.7% [2/3] IFAT positive), no positive hemocultures were obtained (Table 1). Other less abundant species, such as *D. marsupialis* in A1 and A2, *M. murina* and *Micoreus demerarae* in A2, and *Artibeus planirostris* and *Tamandua tetradactyla* in A3, also had detectable parasitemia (as demonstrated by positive hemocultures). Eleven juvenile marsupials were captured, and eight of them (all from A3) were seropositive. All the rodents were negative in both the serological and parasitological assays to *T. cruzi* (Table 1).

Fifteen parasitic isolates were identified as *T. cruzi* (Tc1), and two isolates were identified as *T. rangeli*. Two other isolates, from *P. opossum* and *Artibeus* spp. captured in A3, were positive via hemoculture, but parasitic amplification and molecular characterization were not achieved (Table 1).

3.3. *T. cruzi* infection in domestic mammals

The presence of anti-*T. cruzi* antibodies demonstrates that both dogs and pigs had been exposed to *T. cruzi* infection in all three regions. The prevalence of positive IFAT was highest in A2 ($p < 0.001$), whereas the other two areas displayed similar *T. cruzi* serological prevalence ($p = 0.35$) (Table 2). Only one dog from A2 yielded positive hemocultures. The same dog was examined 7 months later and remained positive by hemoculture. Both cultures were characterized as Tc1 and consistently had positive serological IFAT tests. Another 4 dogs from A2 were evaluated twice (2 positive and 2 negative), and their serological titers remained the same in both examinations. The pigs showed a higher serum prevalence (higher exposure to the *T. cruzi* transmission cycle) than the dogs in A2 ($p = 0.004$). This difference was not statistically significant in the other two areas, due to the low number of dogs ($n = 4$) and pigs ($n = 9$) that were evaluated in A1 and A3, respectively (Table 2).

4. Discussion

The presence of *Didelphis* species has been recognized as a strong indicator of environmental disturbance (Austad, 1988; Olifiers et al., 2005). and as expected, the *Didelphis* species was the most prevalent mammalian species in A3. The prevalence of *T. cruzi* detected by IFAT (indicating the exposure of the wild mammals to the *T. cruzi* transmission cycle) was similar among the studied localities. In contrast, the prevalence of positive hemocultures (which indicates the potential of these hosts to infect vectors) demonstrated that the chance of human contact with infected bugs should be quite different among the studied localities. At least three important conclusions can be drawn from the observed enzootic situations: (i) regardless of the area and its degree of land-use, *P. opossum* was the most important *T. cruzi* reservoir host, as seen in its high relative abundance, high prevalence of *T. cruzi* infection and detectable parasitemia. This marsupial species is associated with gallery forests and can be found in terrestrial and arboreal strata, (ii) the fauna composition and relative abundance alone are insufficient for identifying risk areas because, although exposure to the parasite (positive IFAT)

Table 1
Capture and prevalence of infection by *T. cruzi* in the small mammalian fauna examined in Genipatuba (A1), Ajuai (A2), and peripheral districts (A3) localities, Abaetetuba municipality, in wet (W) and dry (D) seasons.

Small mammalian fauna	Species	Capture prevalence (number of animals)					IFAT (positive mammals)					Hemiculture (parasite recovery)					Parasite characterization		
		A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Marsupialia	<i>D. marsupialis</i>	11.1% (2 ^D)	15.4% (2 ^D)	41.6% (10[5 ^W 5 ^D])	100% (1/1)	100% (2/2)	100% (10/10)	100% (1/1)	100% (2/2)	0% (0/10)	Tcd (1)	Tcd (2)	-						
	<i>M. murina</i>	27.9% (5[1 ^W 4 ^D])	7.7% (1 ^W)	4.2% (1 ^W)	66.7% (1 ^W +1 ^D /3)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/5)	100% (1/1)	0% (0/1)	-	Tcd (1)	-						
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	5.5% (1 ^D)	n.c.	4.2% (1 ^W)	n.d.	n.c.	0% (0/1)	0% (0/1)	n.c.	0% (0/1)	-	n.c.	-						
	<i>Micoureus demerarae</i>	n.c.	7.7% (1 ^D)	4.2% (1 ^W)	n.c.	100% (1/1)	0% (0/1)	n.c.	100% (1/1)	0% (0/1)	n.c.	Tcd (1)	-						
	<i>P. opossum</i>	38.9% (7[2 ^W 5 ^D])	53.8% (7 ^W)	29.1% (7[3 ^W 4 ^D])	85.7% (2 ^W +4 ^D /7)	57.1% (4/7)	71.4% (3 ^W +2 ^D /7)	85.7% (2 ^W +4 ^D /7)	71.4% (5/7)	14.3% (1 ^D /7)	Tcd (6)	Tcd (3)	n.d.						
Rodentia	<i>Mus musculus</i>	n.c.	7.7% (1 ^W)	n.c.	n.c.	0% (0/1)	n.c.	0% (0/1)	n.c.	0% (0/1)	n.c.	-	n.c.						
	<i>Nectomys rattus</i>	n.c.	n.c.	4.2% (1 ^D)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	0% (0/1)	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>Hylaeamys megacephalus</i>	n.c.	7.7% (1 ^D)	n.c.	n.c.	0% (0/1)	n.c.	n.c.	0% (0/1)	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>Oecomys</i> sp.	5.5% (1 ^D)	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>Proechimys roberti</i>	11.1% (2 ^D)	n.c.	n.c.	0% (0/1)	n.c.	n.c.	0% (0/2)	n.c.	n.c.	-	n.c.	n.c.						
Chiroptera	<i>Rattus rattus</i>	n.c.	n.c.	4.2% (1 ^W)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	0% (0/1)	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>Rhipidomys</i> sp.	n.c.	n.c.	8.3% (2 ^D)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	0% (0/2)	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>Artibeus</i> sp. ^b	n.c.	- ^a (1 ^W)	- ^a (22[16 ^W 6 ^D])	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	0% (0/1)	4.5% (1 ^D /22)	n.c.	-	n.d.						
	<i>Carollia perspicillata</i>	n.c.	n.c.	- ^a (3 ^W)	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	0% (0/3)	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>Molossus rufus</i>	- ^a (1 ^D)	n.c.	- ^a (2 ^D)	n.d.	n.c.	n.d.	n.c.	0% (0/1)	0% (0/2)	-	n.c.	-						
Pilosa	<i>Stammira lilium</i>	n.c.	n.c.	- ^a (2 ^D)	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	0% (0/2)	n.c.	n.c.	-	n.c.						
	<i>T. tetradactyla</i>	n.c.	n.c.	- ^a (1 ^W)	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	100% (1/1)	n.c.	n.c.	Tcd							
	Total	19 (3 ^W 16 ^D)	14 (10 ^W 4 ^D)	54 (32 ^W +22 ^D)	75.0% (9/12)	61.5% (8/13)	68.2% (8/22)	41.2% (7/17)	64.3% (9/14)	5.5% (3/54)	Tcd (7)	Tcd (7)	Tcd (1)n.d. (2)						

n.c.: not captured; n.d.: not determined; W: data from wet season (April (A1 and A2) and August (A3) of 2008); D: data from dry season (November (A1 and A2) and December (A3) of 2008).

^a Not included in the calculation of capture prevalence.

^b *Artibeus planirostris* (19) and *Artibeus littratus* (4).

Table 2

Prevalence of *T. cruzi* infection by IFAT and hemocultures in domestic animals examined in Abaetetuba municipality in wet (W) and dry (D) seasons.

Localities	Serum prevalence	Hemoculture prevalence
A1	17.2% (5/29)	0% (0/29)
Dogs	0% ^W (0/4)//n.d. ^D (0/0)	0% (0/4)
Pigs	57.1% ^W (4/7)//5.5% ^D (1/18)	0% (0/25)
A2	63.3% (31/49)	3.7% (2/54 ^a)
Dogs	57.1% ^W (4/7)//27.3% ^D (3/11 ^a)	11.1% (2/18 ^a)
Pigs	92.0% ^W (23/25)//36.4% ^D (4/11)	0% (0/36)
A3	25.3% (39/154)	0% (0/158)
Dogs	45.1% ^W (23/51)//17.0% ^D (16/94)	0% (0/145)
Pigs	0% ^W (0/9)//n.d. ^D (0/0)	0% (0/9)

^a Considering 5 animals that were re-evaluated 7 months later; W: data from wet season (April (A1 and A2) and August (A3) of 2008); D: data from dry season (November (A1 and A2) and December (A3) of 2008).

was similar in all three areas, the potential of these hosts to infect vectors (expressed by positive hemocultures) was different, and (iii) the abundant presence of *D. marsupialis*, considered to be the main reservoir of *T. cruzi*, does not indicate epidemiological risk because the area (A3) that displayed the greatest abundance of this mammalian species was also the area that presented the lowest prevalence of positive hemocultures among examined mammals. Additionally, it was striking that in the Amazon Basin, where TcI is predominant in both human and mammals, the presence of *D. marsupialis* was not as critical for the maintenance of *T. cruzi* in the endemic Abaetetuba area, as has been described for other non-Amazonian regions (Fernandes et al., 1999).

The higher the prevalence of mammals with positive hemocultures in the wild, the greater was the chance that a given vector could acquire the parasite while feeding on an infected mammal. In places where the population reported hunting activities, *T. cruzi* transmission may occur during the cleaning of meat or the contamination of cooking utensils, rather than during ingestion of the meat, which has never been reported to be consumed raw or undercooked. Domestic mammals may become infected by (i) the classical contaminative route, (ii) the ingestion (accidental or not) of infected bugs, (iii) the ingestion of foodstuff contaminated by the feces of infected bugs, and (iv) predation while hunting for infected small wild mammals (only for dogs). The scenario observed in Abaetetuba favor the first two hypotheses. The predation of infected mammals does not seem to be an important infection route for dogs because the majority of dogs' owners did not report this type of behavior. In addition, *T. cruzi* infection was detected in young dogs (that do not yet hunt), and infected bugs are common near human dwellings. Thus, humans and domestic mammals most likely become infected after the accidental ingestion of infected triatomines.

The scenario observed in A2, in which the natural environment is progressively being modified by açai monocultures, is the most common situation throughout rural areas of Pará State. We were unable to explain why this moderately degraded area displayed higher prevalences of positive hemocultures among wild mammals and positive IFATs in domestic mammals when compared to the other

two areas for the following reasons: (i) the dilution-effect hypothesis, based on the reduction of mammalian diversity and the selection of suitable *T. cruzi* reservoirs (Keesing et al., 2006; Roque et al., 2008), does not fit here because the richness and composition of the fauna were similar among the areas, (ii) the recent occupation of the landscape could not be responsible because this area has been exploited by the local population for decades, and (iii) the capture success (approximately 1%) was similar among the three studied areas, demonstrating no bias in between-area comparisons.

This puzzling scenario stresses the importance of selecting domestic mammals as sentinels for identifying areas at risk for the emergence of Chagas disease (Roque and Jansen, 2008). In this sense, in Abaetetuba, dogs act as sentinel hosts because they present a serologically detectable infection and can indicate areas in which *T. cruzi* transmission is occurring, thus enabling the identification of hotspot regions (Xavier et al., 2012). The isolation of *T. cruzi* from the same dog at a 7-month interval and the characterization of the parasite (TcI, which is associated with human infection in this area) indicate that dogs may act as *T. cruzi* reservoirs, being able to infect vectors in A2. When the distinct situations of the three studied localities were considered, the common factor among these areas was the exposure of dogs to *T. cruzi* infection, as expressed by their positive serology. This finding supports an important measure that can be immediately employed in the identification of *T. cruzi* transmission areas: the routine use of domestic animals as sentinels to monitor the epidemiological risk of Chagas disease (Xavier et al., 2012).

The use of dogs as sentinels has already been proposed for Chagas disease (Estrada-Franco et al., 2006; Gurtler et al., 2007) and other zoonotic diseases (Scotch et al., 2009). These animals are usually easy to handle, and their movements can be monitored relatively consistently. Blood collection and subsequent serological assays (or sending the serum samples to governmental central laboratories for diagnosis) do not require great resources or high levels of infrastructure (Jansen and Roque, 2010). The recognition that seropositive dogs reflect exposure to *T. cruzi* and thus, may indicate *T. cruzi* transmission hotspots. Within Abaetetuba, the various enzootic situations each reflect a distinct opportunity for human contact with infected bugs and indicate the importance of adopting unique and micro-regional measures for disease control.

Financial support

The authors would like to thank the following entities for financial support: IOC/FIOCRUZ, VPPLR/FIOCRUZ, CGLab/MS, CNPq, FAPERJ and the European Union Seventh Framework Program Grant 223034 – ChagasEpiNet.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are thankful to Mrs. Elenild Goes and Soraya Santos and the complete staff of the Chagas Disease Program of the Secretary of Health from the state of Pará. We are also grateful to Dr. Vera Bongertz for insightful comments, to Carlos Ardé and Marcos Antônio dos Santos Lima for technical support with the hemocultures, and to the professionals who participated in the field expeditions. The CGLab and Chagas Disease National Control Program of the Brazilian Health Ministry, the Direction of the Oswaldo Cruz Institute, and the Vice-presidency of the Research and Reference Laboratories were also important partners in this study.

References

- Aguilar, H.M., Abad-Franch, F., Dias, J.C., Junqueira, A.C., Coura, J.R., 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1), 47–56.
- Austad, S.N., 1988. The adaptable opossum. *Sci. Am.* 258, 54–59.
- Betts, R.A., Malhi, Y., Roberts, J.T., 2008. The future of the Amazon: new perspectives from climate, ecosystem and social sciences. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 363, 1729–1735.
- Bonvicino, C.R., Otazu, I.B., D'Andrea, P.S., 2002. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *Cyt. Gen. Res.* 97, 200–204.
- Camargo, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnoses of American Trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 8, 227–234.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., Miles, M.A., 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18, 171–176.
- Deane, L.M., 1964. Trypanosomidae in mammals of the Amazon region. 3. Hematology and xenodiagnosis of wild animals of the environs of Belém Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6, 225–232.
- Dias, J.C., 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1), 11–18.
- Estrada-Franco, J.G., Bhatia, V., Az-Albiter, H., Ochoa-Garcia, L., Barbosa, A., Vazquez-Chagoyan, J.C., Martinez-Perez, M.A., Guzman-Bracho, C., Garg, N., 2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs. *Mexico Emerg. Infect. Dis.* 12, 624–630.
- Fernandes, O., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Morel, C.M., Zingales, B., Campbell, D.A., Jansen, A.M., 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118 (2), 161–166.
- Fernandes, O., Santos, S.S., Cupillo, E., Mendonca, B., Derre, R., Junqueira, A.C., Santos, L.C., Sturm, N.R., Naiff, R.D., Barret, T.V., Campbell, D.A., Coura, J.R., 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, 97–99.
- Gurtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Cardinal, M.V., Kitron, U., Cohen, J.E., 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134, 69–82.
- Jansen, A.M., Roque, A.L.R., 2010. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: Telleria, J., Tibyarenc, M. (Eds.), *American Trypanosomiasis – Chagas Disease*, 1st ed. Elsevier, London, pp. 249–276.
- Keesing, F., Holt, R.D., Ostfeld, R.S., 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.* 9, 485–498.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Fraiha, H., Miles, M.A., Draper, C.C., 1979. Chagas's disease in the Amazon Basin. 1. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 193–204.
- Lisboa, C.V., Mangia, R.H., Luz, S.L., Kluczkowski Jr., A., Ferreira, L.F., Ribeiro, C.T., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2006. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology* 133, 603–611.
- Marcili, A., Valente, V.C., Valente, S.A., Junqueira, A.C., da Silva, F.M., Pinto, A.Y., Naiff, R.D., Campaner, M., Coura, J.R., Camargo, E.P., Miles, M.A., Teixeira, M.M., 2009. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39, 615–623.
- Miles, M.A., Póvoa, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J., Ketteridge, D.S., 1981. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 667–674.
- Monteiro, W.M., Magalhaes, L.K., Santana Filho, F.S., Borborema, M., Silveira, H., Barbosa, M.D., 2010. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop. Med. Int. Health* 15, 1049–1051.
- Nobrega, A.A., Garcia, M.H., Tatto, E., Obara, M.T., Costa, E., Sobel, J., Araujo, W.N., 2009. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit. *Brazil Emerg. Infect. Dis.* 15, 653–655.
- Olifiers, N., Gentile, R., Fiszon, J.T., 2005. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. *Braz. J. Biol.* 65, 495–501.
- Pereira, K.S., Schmidt, F.L., Guaraldo, A.M., Franco, R.M., Dias, V.L., Passos, L.A., 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. *J. Food Prot.* 72, 441–446.
- Pinto, A.Y., Ferreira Jr., A.G., Valente, V.C., Harada, G.S., Valente, S.A., 2009. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev. Panam. Salud Publica* 25, 77–83.
- Póvoa, M.M., de Souza, A.A., Naiff, R.D., Arias, J.R., Naiff, M.F., Biancardi, C.B., Miles, M.A., 1984. Chagas' disease in the Amazon basin. IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia. *Brazil. Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 479–487.
- R Development Core Team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Available at: <http://www.R-project.org> (accessed 05.10.11).
- Roque, A.L.R., Xavier, S.C., da Rocha, M.G., Duarte, A.C., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2008. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 742–749.
- Roque, A.L.R., Jansen, A.M., 2008. The importance of sentinel domestic animals to identify risk areas to the emergence of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 191–193.
- Scotch, M., Odofin, L., Rabinowitz, P., 2009. Linkages between animal and human health sentinel data. *BMC Vet. Res.* 5, 15.
- Shaw, J., Lainson, R., Fraiha, H., 1969. Epidemiology of the first autochthonous cases of Chagas' disease recorded in Belem, Pará. *Brazil Rev. Saude Publica* 3, 153–157.
- SVS-MS, 2011. Aspectos Epidemiológicos da doença de Chagas. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454 (accessed 09.10.11).
- Valente, S.A., Valente, V.C., Pinto, A.Y., Barbosa, C.M.J., dos Santos, M.P., Miranda, C.O., Cuervo, P., Fernandes, O., 2009. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 291–297.
- Xavier, S.C., Roque, A.L.R., Lima, V.S., Monteiro, K.J.L., Otaviano, J.C.R., Ferreira-da-Silva, L.F.C., Jansen, A.M., 2012. Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (5), e1647.
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibyarenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm, N.R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12, 240–253.

Artigo 3. Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk

Samanta Cristina das Chagas Xavier, André Luiz Rodrigues Roque, Valdirene dos Santos Lima, Kerla Joeline Lima Monteiro, Joel Carlos Rodrigues Otaviano, Luiz Felipe Coutinho Ferreira da Silva, Ana Maria Jansen

PLOS Neglected Tropical Diseases (2012) 6(5): e1647.

doi:10.1371/journal.pntd.0001647

Medalha Aluizio Prata por apresentação oral. In: 27 Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15 Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2011, Uberaba, 2011. v. 1. p. 46.

O presente trabalho avaliou e comparou diferentes perfis de transmissão de *T. cruzi* em três biomas brasileiros, incluindo áreas avaliadas logo após a ocorrência de surtos de DCA e áreas endêmicas que apresentam altas taxas de infecção em vetores e mamíferos mas sem o registro de casos humanos recentes. Nossos objetivos foram (i) avaliar os impactos de simplificação da fauna de pequenos mamíferos silvestres na prevalência da infecção por *T. cruzi* em cães, (ii) discutir o papel dos cães no ciclo de transmissão de *T. cruzi* e seu papel como hospedeiros sentinela e (iii) avaliar o potencial da análise geospacial pelos métodos de interpolação e álgebra de mapas como uma ferramenta para a construção de mapas para identificar área de risco de doença de Chagas.



Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk

Samanta Cristina das Chagas Xavier¹, André Luiz Rodrigues Roque¹, Valdirene dos Santos Lima¹, Kerla Joeline Lima Monteiro¹, Joel Carlos Rodrigues Otaviano², Luiz Felipe Coutinho Ferreira da Silva³, Ana Maria Jansen^{1*}

1 Laboratory of Tripanosomatid Biology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratory of Quantitative Methods, National School of Public Health Sérgio Arouca, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratory of Cartography, Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

A new epidemiological scenario involving the oral transmission of Chagas disease, mainly in the Amazon basin, requires innovative control measures. Geospatial analyses of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the wild mammals have been scarce. We applied interpolation and map algebra methods to evaluate mammalian fauna variables related to small wild mammals and the *T. cruzi* infection pattern in dogs to identify hotspot areas of transmission. We also evaluated the use of dogs as sentinels of epidemiological risk of Chagas disease. Dogs (n = 649) were examined by two parasitological and three distinct serological assays. kDNA amplification was performed in patent infections, although the infection was mainly sub-patent in dogs. The distribution of *T. cruzi* infection in dogs was not homogeneous, ranging from 11–89% in different localities. The interpolation method and map algebra were employed to test the associations between the lower richness in mammal species and the risk of exposure of dogs to *T. cruzi* infection. Geospatial analysis indicated that the reduction of the mammal fauna (richness and abundance) was associated with higher parasitemia in small wild mammals and higher exposure of dogs to infection. A Generalized Linear Model (GLM) demonstrated that species richness and positive hemocultures in wild mammals were associated with *T. cruzi* infection in dogs. Domestic canine infection rates differed significantly between areas with and without Chagas disease outbreaks (Chi-squared test). Geospatial analysis by interpolation and map algebra methods proved to be a powerful tool in the evaluation of areas of *T. cruzi* transmission. Dog infection was shown to not only be an efficient indicator of reduction of wild mammalian fauna richness but to also act as a signal for the presence of small wild mammals with high parasitemia. The lower richness of small mammal species is discussed as a risk factor for the re-emergence of Chagas disease.

Citation: Xavier SCdC, Roque ALR, Lima VdS, Monteiro KJL, Otaviano JCR, et al. (2012) Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk. PLoS Negl Trop Dis 6(5): e1647. doi:10.1371/journal.pntd.0001647

Editor: Eric Dumonteil, Universidad Autónoma de Yucatán, Mexico

Received: August 9, 2011; **Accepted:** April 3, 2012; **Published:** May 15, 2012

Copyright: © 2012 Xavier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by: Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ); CAPES; The European Union Seventh Framework Program Grant 223034; FAPERJ; FIOCRUZ/IOC–Brazil, IME–Brazil, Secretary of Health from Pará state, Chagas Disease National Control Program of the Brazilian Health Ministry. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jansen@ioc.fiocruz.br

Introduction

The causative agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), is a multi-host parasite capable of infecting almost all tissues of more than one hundred mammal species [1]. Dozens of species of insects from the Triatominae subfamily can act as its vector. Except for the epimastigote form, all other *T. cruzi* evolutive forms can infect mammals by oral and congenital pathways as well as by contamination of the mucosae and skin abrasions by infected triatomine feces. The biological plasticity of *T. cruzi* results in transmission cycles that are characterized by being multivariate and complex on unique temporal and spatial scales [1,2].

Classically, Chagas disease was characterized as prevalent in rural populations, where houses were heavily infested by domiciliated triatomine species, mainly *Triatoma infestans* (Klug, 1834). The campaigns launched by the “Cone Sul” Intergovernmental Commission to eliminate the domiciliary vectors succeeded in that Brazil and other countries in South America are currently

considered free from domestic transmission of Chagas via *Triatoma infestans* [3]. However, extradomiciliary vectorial transmission, domiciliary or peridomestic transmission by non-domiciliated vectors and oral transmission by ingestion of food contaminated by feces from infected insects (the principal method of current transmission), pose new challenges. In fact, mainly in the northern part of the Brazil, the number of Chagas disease outbreaks due to the ingestion of food contaminated by infected triatomine feces are increasing [4–6]. This is currently considered a new epidemiological scenario, demanding systematic surveillance methods that consider all components of the transmission cycle as well as the landscape and ambient conditions in which transmission is occurring.

In several reports, the maintenance of biodiversity has been pointed to as a strong buffering system and regulator in the dispersal of parasites; this has been named the “Dilution Effect”. Such a dilution effect has already been demonstrated to be of importance in the transmission of West Nile encephalitis, Hantavirus, Lyme disease and Schistosomiasis [7,8]. Despite the

Author Summary

The classical methodology of mapping works with discrete units and sharp boundaries does not consider gradient transition areas. Spatial analysis by the interpolation method, followed by map algebra, is able to model the spatial distribution of biological phenomena and their distribution and eventual association with other parameters or variables, with a focus on enhancing the decision power of responsible authorities. Acute Chagas Disease outbreaks are increasing in the Amazon Basin as result of oral transmission. This scenario requires a new approach to identify hotspot transmission areas and implement control measures. We applied a geospatial approach using interpolation and map algebra methods to evaluate mammalian fauna variables related to these outbreaks. We constructed maps with mammalian fauna variables including the infection rates by *Trypanosoma cruzi*, in dogs and small wild mammals. The results obtained by visual examination of the maps were validated by statistical analysis. We observed that high prevalence of *T. cruzi* infection in dogs and small wild mammals was associated with mammal lower richness. Monitoring of *T. cruzi* infection in dogs may be a valuable tool for detecting the fauna lower richness of small wild mammals and elucidating the transmission cycle of *T. cruzi* in the wild.

demonstration of this effect, studies on the impact of biodiversity variation on the *T. cruzi* transmission cycle in the wild mammals using a Geographical Information System (GIS) have been scarce up to now [9–12]. The destruction of an ecosystem imposes important area and food restrictions onto wild mammal populations and may promote their greater contact with humans. The consequence of this process is the increased opportunity for contact among humans, domestic animals and wildlife [2]. In this scenario, the transmission of *T. cruzi* may be increased due to the following: (i) positive selection of generalist species with high transmissibility competence such as *Didelphids* and some caviomorph rodents that undoubtedly adapt and survive in degraded habitats, (ii) the consequent amplification of the parasite's transmission cycle due to higher abundance of competent reservoir species and (iii) the increased prevalence of infected bugs. In addition, the scarcity of food sources for triatomines (i.e., loss of wildlife due to destruction of the environment) led them to invade human dwellings and annexes [13]. Also, the quantitative and spatial patterns of the landscape and artificial lighting in human dwellings play a fundamental role in domiciliary invasion [14]. Human residences acting as light-traps for insects has significant epidemiological importance, as species with high rates of *T. cruzi* infection are drawn to human dwellings [15]. In this scenario, peridomestic mammals are more frequently exposed. Thus, their infection usually precedes the human infection. Hence, dogs have been proposed as being suitable sentinel hosts for *T. cruzi* transmission in areas at risk for human infection [16,17].

Dogs can be important reservoirs of this parasite. They display both a high prevalence of infection and high parasitemia as evidenced in Panama [17], Argentina [18], Venezuela [19], Mexico [20], and the United States [21]. In contrast, in Brazil, a high serum prevalence in dogs has also been described in several areas, but the importance of dogs as a reservoir species has been described as negligible because no high patent parasitemia has been observed in these animals [16,22].

Geospatial analysis based on the fundamental concepts of landscape epidemiology [23] is a powerful tool in the study of the association between landscape- and vector-borne diseases such as

Chagas disease, Schistosomiasis and American Visceral Leishmaniasis [9,10,24]. Geospatial analysis allows for the identification of disease risk areas and disease interactions with the environment [10,24].

The classical methodology of mapping works with discrete units and sharp boundaries, and does not consider transition areas. Nevertheless, environmental and biological phenomena are typically continuous and exhibit a gradual transition from one characteristic to another. Unlike the classical methodology, spatial analysis by the interpolation method, followed by map algebra, is able to model the spatial distribution of the continuous biological phenomena, representing the distribution and association of these phenomena in a more realistic way. This modeling can enhance and facilitate decision making [25].

The present paper evaluates and compares *T. cruzi* infection rates of dogs from three Brazilian biomes, including areas where orally transmitted Chagas disease outbreaks were reported and areas where Chagas disease is endemic. Our objectives were to (i) assess the impacts of lower richness of small wild mammals on the prevalence of *T. cruzi* infection in dogs, (ii) discuss the role of dogs in the transmission cycle of *T. cruzi* and their putative role as sentinels and (iii) to assess the interpolation and map algebra method as a tool for the construction of potential Chagas disease risk area maps.

Materials and Methods

Study area

Dogs (n = 649) were sampled in 3 geographic Brazilian biomes: the Amazon, Caatinga and Pantanal, from 5 states and 13 municipalities (28 localities) (Figure 1 and Table 1).

Among these municipalities, samples were taken immediately after an outbreak of Acute Chagas Disease (ACD) from Redenção, Cachoeiro do Arari, Belém, Curralinho and Axixá do Tocantins. The other monitored areas were Abaetetuba, Monte Alegre, Augustinópolis, Esperantina, Jaguaruana, Russas and João Costa, while Corumbá (Midwest Brazil) was used as a control area. The areas included in our study reflect the locations where our laboratory has been developing research and reference services over the past few years.

Biome Caatinga

The states of Piauí and Ceará display similar patterns: a high density of naturally *T. cruzi* infected Triatominae, which are the main vectors of disease in both regions. Despite that, no new vectorial transmission Chagas disease cases have been observed in the last decade and, as far as we know, only one outbreak has occurred due to oral transmission [2,26].

The municipalities of Jaguaruana, Redenção and Russas, which are endemic for Chagas disease, are located in the mesoregion of lower Jaguaribe, in the northeastern state of Ceará. In Jaguaruana, the average annual temperature ranges from 23°C to 33°C. The collection area consists of clay and sandy soil plains, which are characterized as Caatinga, and include the typical vegetation of semi-arid areas. Redenção (ACD outbreak in 2006) is located in the Baturité mountain range region. The climate is semi-arid, and the average annual temperature ranges from 24°C to 35°C. The collection area, originally part of a tropical semi-humid forest, is currently characterized by secondary vegetation consisting of small trees (up to 6 m), rocky formations, and remnant patches of semi-humid forest near deforested areas occupied by monoculture plantations or unplanned households (slums). The municipality of Russas is located in the state of Ceará. The climate is semi-arid with average temperatures ranging from 18.8°C to 35.4°C. The

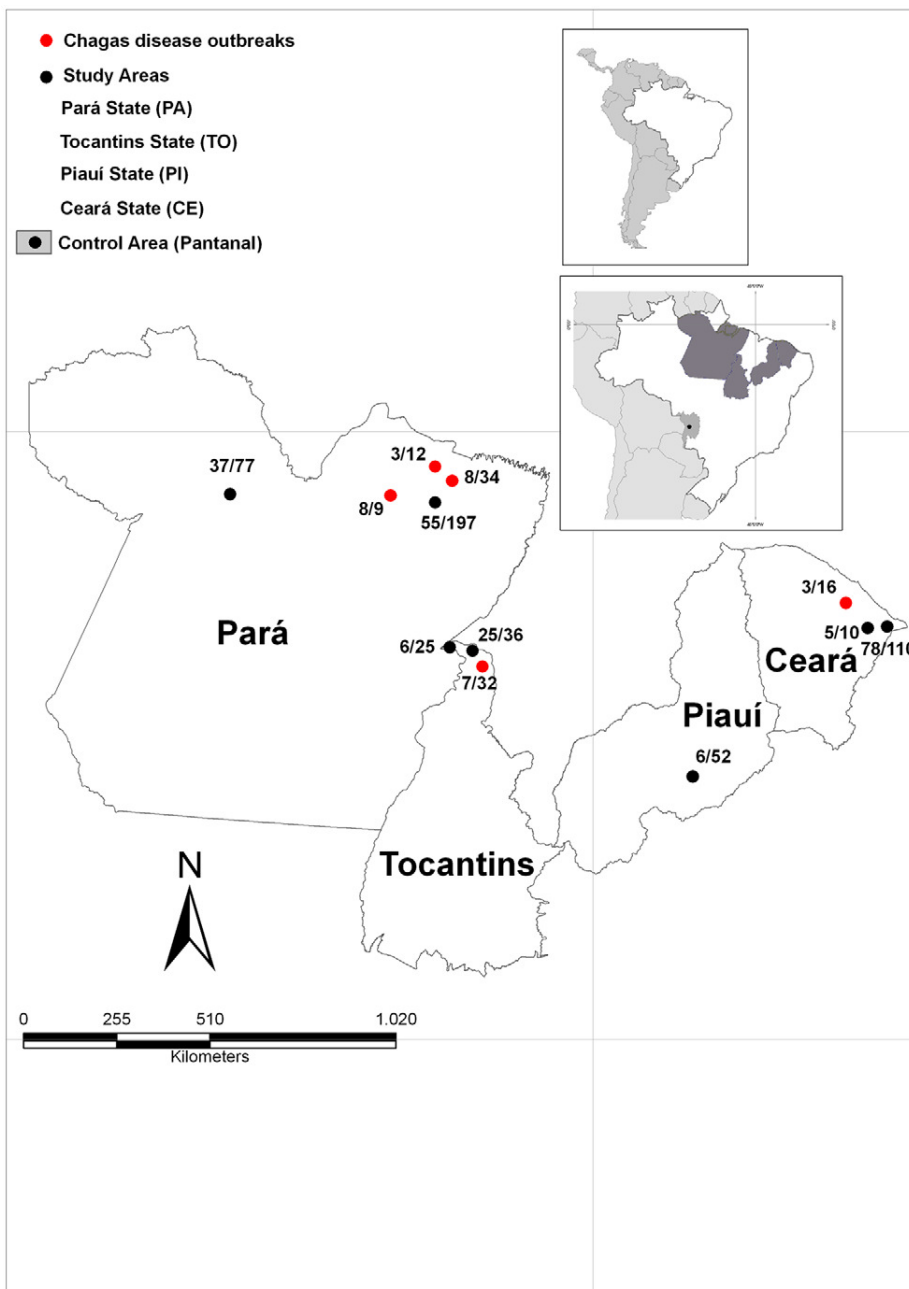


Figure 1. Geographical location of study area. Study areas are located in the 3 geographic Brazilian biomes: Amazon (Pará and Tocantins states), Caatinga (Piauí and Ceará states) and Pantanal (Mato Grosso do Sul state, control area). **Red markers** indicate areas investigated immediately after the occurrence of Chagas disease outbreaks; **Black markers** indicate non-outbreak areas. doi:10.1371/journal.pntd.0001647.g001

vegetation comprise open scrub and savanna, with deciduous thorny forest areas. The municipality of João Costa is located in the southeast of the state of Piauí and is characterized as a megathermic semi-arid region. The average annual temperature ranges from 12°C to 39°C. The vegetation in this area displays the typical Caatinga features and residual semi-deciduous forest patches.

Amazon biome

T. cruzi oral transmission in the Brazilian Amazon region has been reported since 1968 [5,27], although this region was

considered an endemic area for many years. Just after 2005, when the prevalence of Chagas cases in other parts of the country decreased and surveillance in the Amazonian region was improved, microepidemics of ACD began to appear regularly and frequently, mainly associated with the consumption of the palm-tree fruit açai and other foods [4–6].

The municipalities of Abatetetuba and Belém (ACD outbreak in 2009) are located in the northeastern mesoregion of the state of Pará. Cachoeiro do Arari (ACD outbreak in 2006) and Curralinho (ACD outbreak in 2009) are located in the mesoregion of Marajó,

Table 1. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs from three biomes: Caatinga, Amazon Forest and Pantanal.

Biome/State	Municipalities	Localities	Coordinates		Serological+/total (%)	
Caatinga	Jaguaruana	Caatinguinha	04°48'28"S	37°47'09"W	11/26 (42)	
	Ceará		Córrego das Melancias	04°50'10"S	37°47'20"W	22/23 (96)
			Dió	04°50'23"S	37°46'19"W	19/29 (65)
			Perímetro Irrigado	04°49'18"S	37°50'22"W	18/23 (78)
			Figueiredo do Bruno	04°47'45"S	37°49'19"W	8/9 (89)
	78/110 (71)					
	Redenção* ²		Salobro	04°11'48"S	38°42'56"W	1/2 (50)
			Alto Cassiano	04°13'18"S	38°43'56"W	1/9 (11)
			Manoel Dias	04°10'54"S	38°43'45"W	1/2 (50)
			Sítio Outeiro	04°12'21"S	38°44'09"W	0/3
3/16 (19)						
Russas	Cipó	04°57'47"S	38°09'18"W	5/10 (50)		
Piauí	João Costa ¹	Urban Area	08°33'24"S	42°26'12"W	6/52 (11)	
Amazon Forest						
Tocantins	Augustinópolis	2000	05°24'11"S	48°01'09"W	11/12 (92)	
		São Roque	05°30'26"S	48°02'46"W	14/24 (58)	
	25/36 (69)					
	Esperantina	São Francisco	05°23'32"S	48°28'46"W	6/25 (24)	
	Aixá do Tocantins*	Lagoa de São Salvador	05°38'37"S	47°44'19"W	4/10 (40)	
		Piquizeiro	05°42'09"S	47°44'29"W	3/22 (14)	
7/32 (22)						
Pará	Abaetetuba	Ajuai**	01°45'29"S	49°03'25"W	6/18 (33)	
		Genipauba	01°45'29"S	48°54'01"W	0/4	
		Panacauera	01°48'18"S	49°06'15"W	11/26 (42)	
		Urban Area	01°42'58"S	48°51'30"W	38/149 (25)	
	55/197 (28)					
	Belém*	Jurunas	01°28'14"S	48°30'10"W	2/15 (13)	
		Val de Cans	01°23'12"S	48°28'17"W	6/19 (32)	
	8/34 (23)					
	Cachoeira do Arari* ²		Aranaí	01°05'42"S	48°39'39"W	2/4 (50)
			Furinho	01°05'14"S	48°39'07"W	0/2
			Mata Fome	01°04'15"S	48°37'50"W	1/5 (20)
			Sede Furo Grande	01°05'31"S	48°39'14"W	0/1
	3/12 (25)					
	Curralinho*	São José da Povoação**	01°40'28"S	50°08'41"W	8/9 (89)	
Monte Alegre	Setor 11***	01°38'20"S	54°14'32"W	37/77 (48)		
Pantanal (Control Area)						
Mato Grosso do Sul	Corumbá	Farms	19°34'29"S	56°14'44"W	0/39	
241/649 (37)						

Footnotes

*Chagas disease outbreaks.

**Positive hemoculture.

***Trypomastigote forms in fresh blood preparations.

¹-Data published in [22].²-Data published in [2].

doi:10.1371/journal.pntd.0001647.t001

while Monte Alegre is located in the lower Amazon mesoregion of Pará. The common climate is characterized as tropical humid, with regular rainfall and winds, and temperatures between 27°C and 36°C. The area is known as varzean, which is a freshwater swamp forest. In most of the collection areas, the original native

vegetation (Amazonian forest) is being replaced by an extensive açai fruit monoculture with a few remaining patches of the original vegetation at the river banks. The municipalities of Augustinópolis, Aixá do Tocantins (ACD outbreak in 2009) and Esperantina are located in the northwestern mesoregion of the Tocantins state,

almost at the border of Pará. The climate of these cities is tropical subhumid, with maximum temperatures occurring during the dry season that reach 39°C.

Pantanal biome (control area)

This region presents an enzootic cycle of *T. cruzi* transmission; however, it is not considered an endemic area for Chagas disease, as human cases have never been recorded in the region. This region comprises a large natural environment with a multiplicity of habitats and a wide variety of biodiversity. Farms encompass an area located in the core of a biodiversity corridor in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil.

Wild mammals

The capture of small wild and synanthropic mammals was performed as follows: live traps were arranged in linear transects, and the capture points were established with Tomahawk (Tomahawk Live Traps, Tomahawk, WI) and Sherman (H. B. Sherman Traps, Tallahassee, FL) traps. The traps were baited with a mixture of peanut butter, banana, oat and bacon and set at 20-m intervals in all types of vegetation formations and habitats. The trapped animals were taken to a field laboratory ≤ 2 km from the capture point, where the remaining procedures were performed. The trapped animals were examined for the prevalence and pattern of *T. cruzi* infection, as previously described [2,9,28,29]. Some data (from the municipalities of João Costa, Cachoeira do Arari, Redenção) used in this meta-analysis comprise both already published studies [2,9,22] and some unpublished data (from the municipalities of Jaguaruana, Russas, Abaetetuba, Belém, Monte Alegre, Curralinho, Axixá do Tocantins, Augustinópolis and Esperantina) were collected by our laboratory. The sampling efforts to capture mammals were similar in all 28 localities (820-1.100 traps/night), with 4 or 5 nights of capture each season, and the captures were performed in every season of the year (Table S1 and Figure S1).

Selection of dogs

The active search for dogs was conducted in the houses neighboring the linear transects where the small wild and synanthropic mammals were captured and in the houses where oral outbreaks of Chagas disease had occurred. Blood samples were collected from 649 dogs living in houses located in twelve municipalities from four Brazilian states. Dog blood was collected in three biomes; collections from the Caatinga ($n=188$) and Amazon ($n=422$) biomes were compared to collections from the Pantanal biome ($n=39$) (Table 1).

Parasitological and serological surveys

Herein, we considered that each dog represents one single event, even when related to the same house. This is due to: (i) dogs are separated individuals, differing each other in age, behavior, activities, etc... This fact is reflected in their different degrees of *T. cruzi* exposition; (ii) dogs have no pack behavior; and (iii) dogs are not confined in the intradomociliar area and have different and multiple opportunities to be infected during their activities. The interpretation of our results was based on different patterns of infection of the mammals. Fresh blood smears and hemoculture, when positive (especially the first due to its lower sensibility), show a high parasite load in the peripheral blood of the animals, which means a high chance of transmission to the vector, reflecting transmissibility. These tests are very specific but less sensitive – their importance lies in detecting infected animals that may represent a source of infection for the vector. Serological assays indicate infection of the animal. Therefore, serological positive and

parasitological negative tests for a given animal demonstrates its infection with a low rate of parasite, this mammal is a host of the parasite, but is not involved in the amplification of parasite populations, i.e., its transmission potential to the vector is low.

Blood was collected from dogs in heparinized vacutainer tubes by puncture of the cephalic vein. To evaluate *T. cruzi* infection, four tests were conducted. Two of these tests were parasitological assays including (i) the examination of fresh blood smears (microscopic analysis) and (ii) a hemoculture assay, in which 0.2–0.4 mL of blood was cultured in two tubes containing Novy-Mc Neal-Nicole medium [NNN] with a liver infusion tryptose medium [LIT] overlay. When those tests were positive, the parasites were amplified for cryopreservation and DNA extraction for molecular characterization and two serologic diagnostic assays were performed: (iii) the Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) as previously described [30] and (iv) the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Disease diagnosis was based on serology by the ELISA (Cut-off: optical absorbance ≥ 0.200 , mean ± 3 SD) and IFAT (Cut-off: titer of 1/40). Each microtiter polystyrene plate had 2 positive and 2 negative control sera. Animals were defined as seropositive when samples were reactive in both the IFAT and ELISA. Seropositive animals that displayed negative results in the parasitological assays were considered to have sub-patent infections. To evaluate possible cross-reactions and/or mixed infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp., dog sera were also assayed for *Leishmania infantum* using IFAT and the Rapid Test for Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) (TR DPP[®], Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The IFAT cut-off value adopted for *T. cruzi* infection was 1/40 when the IFAT result for *L. infantum* was lower than 1/40 and the DPP results were negative. When infected by *L. infantum*, dogs were considered positive for *T. cruzi* infection only when the IFAT titer was 1/80 or higher. For *L. infantum* infection, the adopted IFAT cut-off value was 1/40 when the infection was also confirmed by DPP and 1/80 when the DPP assay was negative. The interpretation of these tests in assemblage indicates the role played by the tested mammals in the transmission cycle.

PCR amplification

DNA was extracted from logarithmic phase cultures and serum samples of dogs with patent parasitemia (positive blood slide smears) in the absence of hemocultivated parasites, using a phenol chloroform protocol [31]. PCR was performed using the primer pair S35 (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA-3') and S36 (5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') [31]. Cyclic amplifications were performed with an initial denaturation of five minutes at 94°C, followed by 35 amplification cycles (94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds) and a final ten-minute elongation step at 72°C. Each 25 μ L total reaction volume contained 25 ng total DNA, 10 μ mol of each primer, 0.4 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, and 2.5 U Taq polymerase (AmpliTaq[®]Gold, Applied Biosystems). PCR products were visualized on a 2% agarose gel after ethidium bromide staining. PCR resulted in a 330-bp amplicon for *T. cruzi* and a 760-bp amplicon and heterogeneous set of fragments ranging in size from 300 to 450 bp for *T. rangeli*.

Geospatial analysis

The base map was acquired from the IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). The coordinates of all biological data were captured using a hand-held GPS (Global Positioning System) receiver (Garmin III GPS, Garmin International, Olathe, KS,

USA) and recorded in the WGS 84 Datum (World Geodetic System 1984) geodetic coordinate system.

Maps representing the spatial distribution of *T. cruzi* infected dogs (response variable) and species richness, abundance and parasitological and serological prevalence of wild small mammals (covariables) were generated using the interpolation method of Inverse Distance Weighted (IDW) with the 12 nearest sampled data points selected. However, for map analysis, only the polygon of the studied municipality, (*i.e.*, only a local analysis) was used. A variable radius was applied specifying the number of nearest input sample points ($n = 12$) to perform interpolation. After that, we used map algebra to find evidence of spatial correlation of the response variable with each covariable by the use of arithmetic operators (subtraction). The algebraic analysis of maps (spatial variables, response variable and covariables), represented by pixels, results a new map where the values in each geographical position was the result of subtraction (in our case) of the values of the variables associated with the geographical position.

The term “map algebra” was established by Dana Tomlin in the early 1980s [32] with the development of the “Map Analysis Package GIS”. Map algebra provides tools to perform spatial analysis operations and is based on a matrix algebra, which refers to the algebraic manipulation of matrices (as maps in raster data structures). Spatial data were analyzed in a GIS platform using ArcGis 9.3 software (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA).

Statistical analysis

For the analysis of the proposed hypothesis (small wild mammal lower richness is associated with the increase of prevalence of *T. cruzi* infected dogs), we used the GLMs (Generalized Linear Models) with a Poisson link function [33]. For the response variable we used the infection of the dogs (based on serological assays – IFAT and ELISA, as described above). The following covariables were included: (1) Species richness of small wild mammals collected (DS): The richness was calculated as being the number of species captured in each area; (2) Abundance of small wild mammals collected (NM): The abundance for each localities was based on: $n = \text{total number of mammals captured}$. In the present model, aiming to evaluate the influence of both parameters (normally associated in ecological studies), these two covariables (DS*NM) were considered together and estimated by the “manual” selection method; (3) Prevalence of small wild mammals with positive *T. cruzi* parasitological assays (THC): That included (i) the finding of flagellates with typical *T. cruzi* morphology in fresh blood examination and (ii) the isolation and characterization of *T. cruzi* from blood in axenic medium – hemoculture; (4) Prevalence of small wild mammals with positive *T. cruzi* serological assay: based on the detection of specific anti-*T. cruzi* antibodies in the IFAT. The criterion of comparison between the models was based on the Akaike Information Criterion (AIC) and residual deviance [34,35] to determine which model fits best considering the level of significance ($p < 0.05$). For the analysis of normality, the Shapiro-Wilk normality test was performed. Each model is specified as a combination of covariables that can influence the probabilities of dogs becoming infected. The comparison between dogs from Chagas disease-outbreak and non-outbreak areas were calculated using 2×2 contingency tables along with a Chi-squared test. Each dog was considered as one independent event, even when living in the same house. Both analyses were performed using the software R (Version 2.11.1) [36].

Owner consent and protocol of ethical treatment of animals

All wild animal manipulation procedures were performed in accordance with the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) following the guidelines of the Animal Ethics Committee (CEUA) protocol of FIOCRUZ (Oswaldo Cruz Institute Foundation), Ministry of Health, Brazil. All field workers who manipulated animals directly were adequately dressed with protective equipment, following protocols previously approved by the CEUA-FIOCRUZ Committees of Biosafety and of Bioethics (licenses: P0007-99; P0179-03; L0015-07; P0292/06). The wild animal captures were licensed by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) licenses 068-2005 and 225-2006 (IBAMA/CGFAU/LIC). In all cases, consent from the dog owners was obtained. In addition, the owners also helped handle the animals during sampling to avoid incidents. A canine standard questionnaire was applied. For each dog, the questionnaire included name, sex, age, size, color and main phenotypic features, birthplace, age at which the pet entered the house, the dog’s main function and movement areas.

Results

Parasitological and molecular characterization

Trypanosoma cruzi infection in dogs was sub-patent in the majority of the cases. Only five dogs from Monte Alegre displayed trypomastigote forms in fresh blood preparations (Table 1). These dogs with patent parasitemia displayed severe clinical symptoms (fever, pale mucous membranes, generalized edema, rigid abdomen and splenomegaly), and the disease was fatal for two of them. Hemocultures performed in the three dogs surviving two months after the first blood collection were negative; these dogs produced Chagas negative hemocultures 3 months after the first blood collection. Positive hemocultures were detected only in two dogs, one from Abaetetuba and one from Currálinho. From one of these two dogs, it was possible to isolate the *T. cruzi* on two occasions after an interval of seven months (Abaetetuba). Molecular characterization was performed on these isolates and on five serum samples of dogs from Monte Alegre. *T. cruzi* k-DNA was amplified from these six dogs, from both serum and culture samples, with the exception of one dog from Currálinho with *Trypanosoma rangeli* (Figure 2 and Table 1).

Serological data

Overall, the distribution of *T. cruzi* infection in dogs was not homogeneous among houses, localities, municipalities and/or biomes (Figure 3), as shown by the high variation in *T. cruzi* prevalence in dogs in the different municipalities (11–89%, Table 1). Within the same biome, municipalities with high and low *T. cruzi* seroprevalence in dogs were observed. In the Jaguaruana and João Costa municipalities located in the Caatinga biome, dogs displayed 71% and 11% seropositivity, respectively. Similar differences in dog seroprevalence were also observed in distinct localities in the Amazon biome (22–89%). Even within the same municipality, seroprevalence in dogs was not homogeneous. In Abaetetuba (Amazonia biome), the seroprevalence in dogs ranged from 0 to 42% according to the locality. In the Pantanal, where Chagas disease is not reported, all dogs serologically examined were negative for *T. cruzi* infection ($n = 39$) (Table 1). Each dog was considered as one independent event, even when living in the same house due to the fact that different seroprevalence rates could be observed in dogs of one same house. The not homogeneous distribution of *T. cruzi* seropreva-

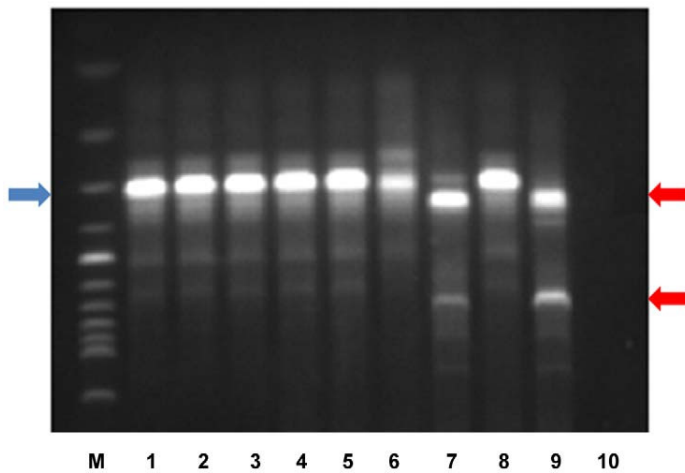


Figure 2. *Trypanosoma* sp. characterization in blood samples from dogs from Pará State. Parasite identification targeting the variable region of minicircle kDNA, **Lanes 1–5** DNA extracted from serum samples of dogs designated LBT1818, LBT1819, LBT1820, LBT1821 and LBT1822, respectively; **lane 6:** FNS258; **lane 7** LBT1831; **lane 8** *T. cruzi* positive control; **lane 9** *T. rangeli* positive control; **lane 10** negative control; **lane M:** 100-bp DNA ladder. **Red arrows:** 760 bp fragment and fragments varying in size from 300 to 450 bp derived from *T. rangeli* minicircles; **Blue arrow:** 330-bp fragment derived from *T. cruzi* minicircles.
doi:10.1371/journal.pntd.0001647.g002

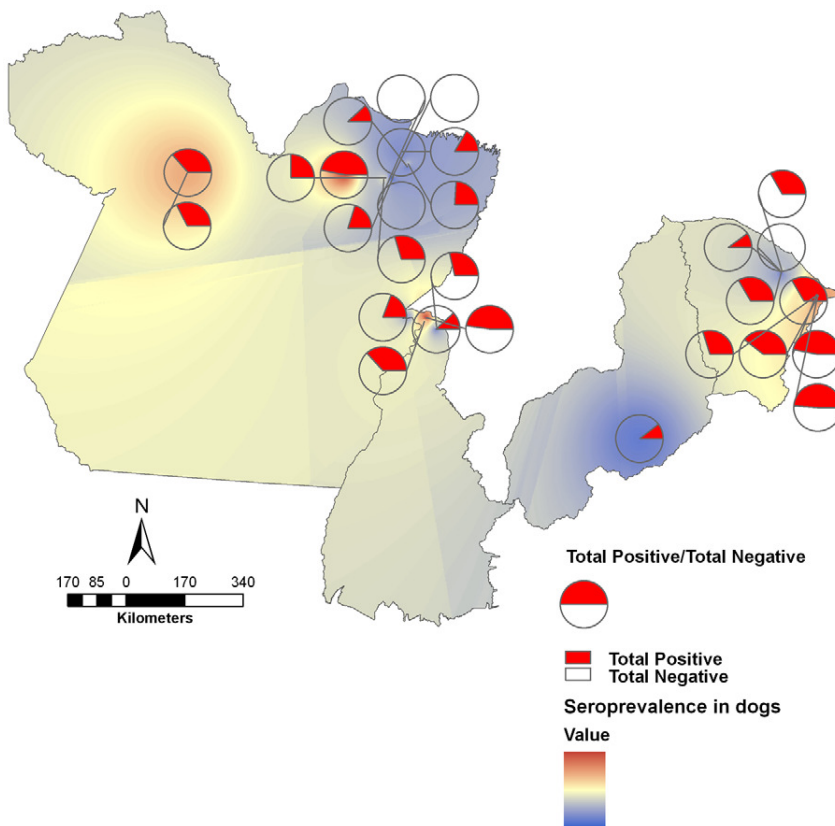


Figure 3. Mapping of distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs (municipalities). Distribution of seroprevalence in dogs by the interpolation maps method (Inverse Distance Weighted - IDW): Total positive/Total tested.
doi:10.1371/journal.pntd.0001647.g003

lence in dogs of one single house reflect that these dogs have not been equally exposed to *T. cruzi* infection.

Co-infection with *Leishmania infantum*

Co-infection was observed in 17% and 16% of sera from dogs examined in the Caatinga and Amazon biomes, respectively, as evaluated by the IFAT and/or Quick Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis (CVL) (TR DPP®, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), indicating co-infection by both parasite species.

Geospatial analysis

An analysis of the maps generated using the interpolation method indicated an inverse distribution correlation among *T. cruzi* infection in dogs and a decrease in the richness and abundance of small wild mammal species. This spatial correlation evidence was confirmed by map algebra and demonstrated that among the response variable and covariables there is also an inverse correlation, which indicated that in areas with greater richness and abundance of small mammal species, dogs were less prone to be infected with *T. cruzi*. Since the resulting map algebra was subtracted from inverse correlation with two variables our

result shows a distribution that is not homogeneous. A more indirect indication was given by the rates of parasitological and serological *T. cruzi* prevalence in dogs (Figure 4A–D).

Statistical analysis

Statistical analysis confirmed the generated maps and demonstrated that the covariables DS (Species Richness) and THC (parasitological prevalence) influence the average response variable (*T. cruzi* infection in dogs), polygons of the studied municipalities. The estimated DS (-0.095596) indicates that in areas that present greater mammal biodiversity, dogs are less prone to infection by *T. cruzi*. The estimated TCH (0.009066) indicated that in areas that present higher parasitological prevalence of infection in the small wild mammals, dogs are more exposed to the *T. cruzi* infection. The estimated rate of *T. cruzi* infection in dogs was 0.909 (CI_{95%} $0.870-0.949$) for DS and 1.009 (CI_{95%} $1.004-1.014$) for TCH. The analysis of residuals versus fitted values indicated that the behavior of the variance of residuals and homoscedasticity presented random residuals. For confirmation of the normality of the data, the Shapiro-Wilk test was performed ($W=0.9814$), $P=0.8714$ at 5%. We found a significant difference in the *T. cruzi* infection rate between dogs sampled from areas that suffered a

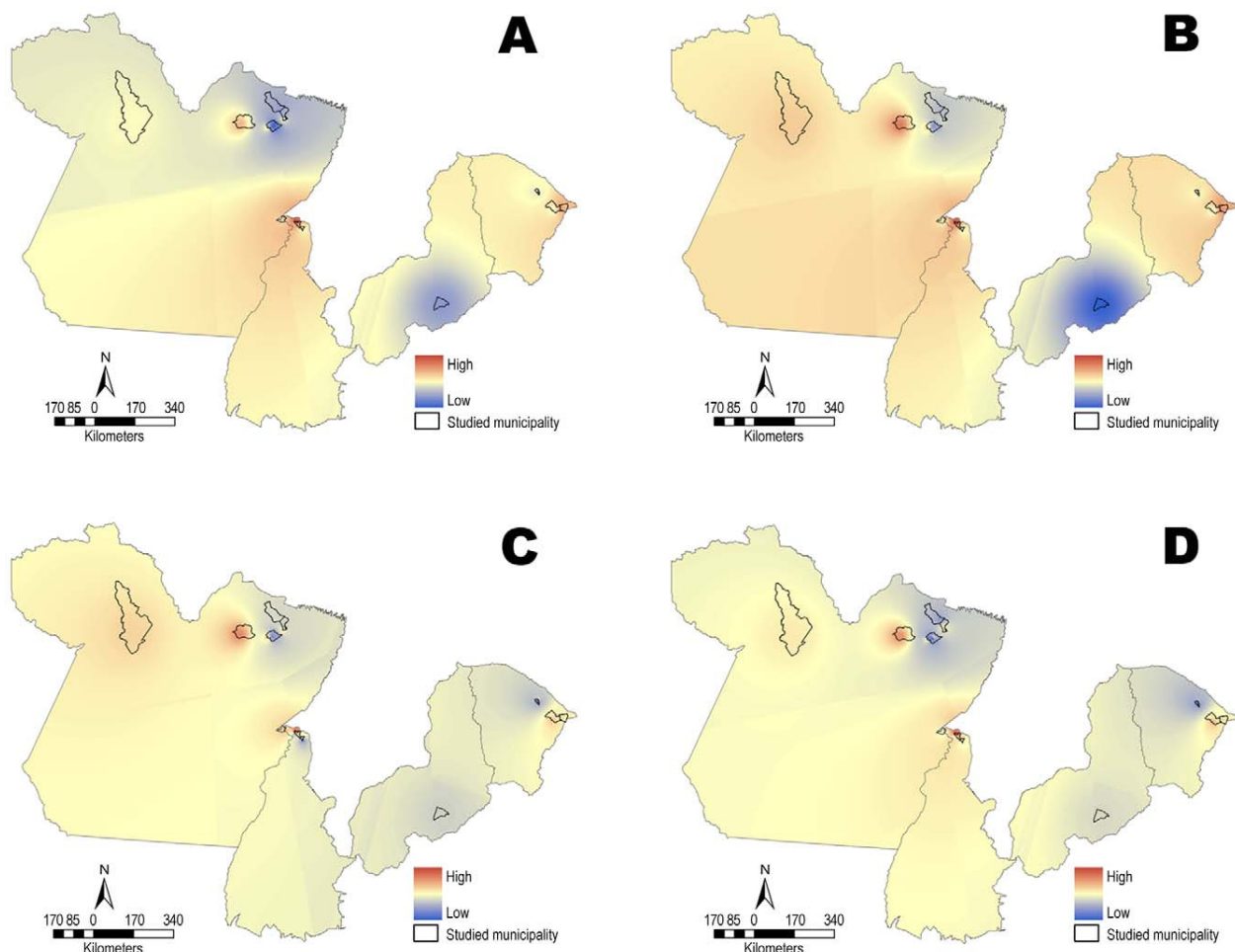


Figure 4. Mapping of lower richness of wild mammal species. A geospatial analysis by the map algebra of the association of *T. cruzi* infection in dogs (response variable) with covariables: (A) species richness (DS) of small wild mammals; (B) abundance (NM) of small wild mammals; (C) serological prevalence (IFAT) of small wild mammals; (D) parasitological prevalence (THC) of small wild mammals. doi:10.1371/journal.pntd.0001647.g004

Chagas disease outbreak compared to dogs from non-outbreak areas (28/103 versus 217/546, Chi-squared 5.81, $P=0.01$). In other words, this probability would rise 0.5 points in areas with Chagas disease outbreaks.

Discussion

The sustainability of successful control of Chagas disease requires a more accurate knowledge of the environmental factors that underlie the transmission cycle of this parasite in the wild, mainly, if there are still unknown and undetermined aspects of the current epidemiology of this trypanosomiasis. This demands multidisciplinary and complex studies, as *Trypanosoma cruzi* is a multihost parasite that displays a huge intraspecific heterogeneity and a complex transmission cycle that may exhibit local peculiarities. Oral transmission of *T. cruzi* to humans was reported as sporadic until 2004, but in the following years, this epidemiological profile of transmission became increasingly important in the epidemiology of Chagas disease, particularly in the Amazon region [4–6]. Outside this region, oral transmission has also been responsible for recent outbreaks of ACD in several Brazilian states, mainly in the North [2,3]. Such outbreaks have also been reported in other Latin American countries [37,38].

Our results indicate that infection by *T. cruzi* in dogs is not homogeneous but focal, as demonstrated by the differences in seroprevalence among close localities; these differences may be due to landscape features. The seroprevalence observed in dogs could be associated with their proximity to forest and rural areas and with the loss of richness and abundance and rates of infection of the small wild mammal fauna. One aspect that distinguishes the present and previous data of our group from other studies is the scarcity of the number of dogs that displayed positive hemocultures [17–19]. In fact, dogs in Brazil are apparently only rarely involved in the amplification of *T. cruzi* and seem to play a minor role in the dispersion of the parasite. Even the dogs from Monte Alegre/PA seem not to be of epidemiological importance because hemocultures were negative 3 months after the detection of *T. cruzi* in their blood smears.

The importance of a host species as a reservoir of a vector-borne parasite mainly depends on its prevalence of infection, capacity to infect the vectors, and the rate of host-vector contact [39]. A possible consequence of a local simplification of the small wild mammal fauna, where generalist mammals are favored at the expense of specialist species, is an increase in the rate of infection among the remnant mammalian fauna when the selected species are competent reservoirs of *T. cruzi*. As a result, the parasite population increases in the area, favoring vector infection and exposure of dogs to parasites, as reflected by their seroprevalence. This scenario suggests that the assessment of potential disease risk factors requires detailed knowledge of local, site-specific conditions. The small wild mammalian fauna diversity plays an important role in the profile of the enzootic infection patterns in a given area, as shown by the high transmission focus described in a previous study [22].

Overall, despite many remaining questions, the current evidence indicates that preserving intact ecosystems and their endemic biodiversity should generally reduce the prevalence of infectious diseases [7,8].

The determination of the spatial distribution of the elements that compose the epidemiological chain of a parasitic disease is of pivotal importance for the determination of trends and risk evaluation. Moreover, it is worth mentioning that the attempts to control a given multihost parasite based on the control of one single vector or host species will always be insufficient because

parasite transmission very rarely relies on a single system. The simplification of the mammalian host diversity, associated with an increase in the abundance of competent reservoir host species as described here is certainly one of the risk factors involved in the reemergence of Chagas disease [9]. Reduced disease risk with increasing host diversity is especially likely when pathogen transmission is frequency-dependent, and when pathogen transmission is greater within a species than between species, particularly when the most competent hosts are also relatively abundant and widespread [7].

Piauí and Ceará display similar patterns regarding the presence of a high density of naturally *T. cruzi* infected Triatominae, which are the main vectors in both regions. Our results demonstrate a high prevalence of *T. cruzi* infection in dogs from the Caatinga, as described in previous studies from our group [9,22]. Despite this high prevalence, no new Chagas disease cases of vectorial transmission have been observed there in the last decade [13,26]. This may reflect the effectiveness of the already long-lasting epidemiological surveillance campaigns exerted in these areas despite their lack of regularity. Local people are aware of the risk of disease and adopt local measures to avoid infection risk. Further, although dogs were exposed to the *T. cruzi* transmission cycle and are hosts of the parasite, they do not display high parasitemia (i.e., had negative hemocultures) and are therefore not involved in the amplification of parasite populations, so consequently, the potential for transmission from these dogs to the vector is low.

The high prevalence of seropositive dogs in the Amazon region can be attributed to the elevated rate of contact among these domestic animals and the wild environment and because the houses are practically located inside wild forest areas. In these areas, it is difficult to delimit the of peridomestic and wild areas, and many local inhabitants and dogs are involved in hunting activities. Empirical evidence indicates that habitat fragmentation can increase or decrease disease prevalence (and also *T. cruzi* infection among wild small mammals) within a host species, depending on the specific biology of the host–parasite relationship [28,40]. Another important factor that should be taken into account is the importance of the definition of risk area based on the characteristics of the micro-regional management of domestic animals that are sometimes reared in semi-extensive ways. In this case, these animals are more exposed to the wild cycle of transmission and this is reflected by a high prevalence of infection. The presence of seropositive dogs in strictly domiciled habitats, as observed in a previous study in Navegantes, in the state of Santa Catarina, indicates, for example, the presence of a transmission cycle very close to the animal's home [2]. Moreover, the high prevalence of infection in domestic mammals reared in a semi-extensive way (such as pigs from Cachoeira do Arari/PA) indicates that transmission is occurring farther from homes but within the areas of interface between the peridomestic and wild environments [16].

Surveillance for canine Chagas disease should be a useful tool for the design of suitable epidemiological control programs in areas where sylvatic triatomines are responsible for human infection, as in many rural endemic areas [17].

The geospatial analysis approach involving interpolation and the map algebra method are a powerful tool in the study of the association between lower richness and areas with high transmission rates in small wild mammals and the risk of exposure of dogs to *T. cruzi* infection. Dogs are important sentinels and efficient indicators of areas at risk for Chagas disease outbreaks, lower richness in wild mammalian fauna diversity and selection of suitable *T. cruzi* reservoir hosts.

Therefore, the monitoring of domestic animals can and should be used as a first measure in the diagnosis of areas with elevated risk of *T. cruzi* transmission. Dogs, in particular, are easy to handle and have a generally accessible traceability. The collection of blood from these hosts and serologic testing (the sending of material to a central diagnostic institute) does not require great cost and infrastructure. Moreover, blood samples can be easily obtained in areas where dogs are routinely collected and tested for *Leishmania* sp. Or the anti-rabies vaccination campaigns can be used to collect blood from a representative sample of dogs in a given area. The presence of seropositive dogs reflects exposure to *T. cruzi* and points to the transmission of the parasite in areas where these animals roam. Once this measure is implemented, we should have an efficient indicator of areas at risk for human Chagas disease that require particular epidemiological investigation, implementation of control measures and health education.

Supporting Information

Figure S1 Mapping of distribution of parasitological prevalence, richness and abundance of small wild mammals. Geospatial analysis showed that the lower richness of the mammal fauna (richness and abundance) was associated with higher parasitemia in small wild mammals and higher exposition of dogs to infection. (TIF)

References

- Jansen AM, Roque, ALR (2010) Domestic and wild mammalian reservoirs. In: American Trypanosomiasis, Chagas disease - one hundred years of research Telleria J, Tibayrenc M, eds. London: Elsevier. pp 249–276.
- Roque ALR, Xavier SCC, da Rocha MG, Duarte AC, et al. (2008) *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg* 79: 742–749.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583–588.
- Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, et al. (2009) Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15: 653–655.
- Nobuko Y, Tyler KM, Llewellyn MS (2011) Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol* In press.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, et al. (2009) Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *Journal of Food Protection* 72(2): 441–446.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS (2006) Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett* 9: 485–498.
- Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, DrewHarvell C, et al. (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647–652.
- Xavier SCC, Vaz VC, D'Andrea PS, Herrera L, Emperaire L, et al. (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: 119–128.
- Kitron U, Clennon JA, Cecere MC, Gürtler RE, King CH, et al. (2006) Upscale or downscale: applications of fine scale remotely sensed data to Chagas disease in Argentina and schistosomiasis in Kenya. *Geospat Health* 1(1): 49–58.
- Lambert RC, Kolivras KN, Resler LM, Brewster CC, et al. (2008) The potential for emergence of Chagas disease in the United States. *Geospat Health* 2(2): 227–239.
- Mott KE, Nuttall I, Desjeux P, Cattand P (1995) New geographical approaches to control of some parasitic zoonoses. *WHO Bulletin OMS* 73(2): 247–257.
- Lima M M, Coutinho CFS, Gomes TF, Oliveira TG, Duarte R, et al. (2008) Risk Presented by Copernicia prunifera Palm Trees in the *Rhodnius nasutus* Distribution in a Chagas Disease-endemic Area of the Brazilian Northeast. *Am J Trop Med Hyg* 79(5): 750–754.
- Leite GR, Santos CB, Falgueto A (2011) Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. *J Biogeogr* 38: 651–663.
- Santos CB, Leite GR, Ferreira GEM, Ferreira AL (2006) Infecção natural de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) por flagelados morfológicamente semelhantes a *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 89–91.
- Roque ALR, Jansen AM (2008) Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 191–193.

Table S1 Prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* in small wild mammals. Caatinga, Amazon Forest and Pantanal. Richness indicates the number of species captured in each area; Prevalence of small wild mammals with positive *T. cruzi* parasitological assays includes mammals that displayed: flagellates with typical *T. cruzi* morphology in fresh blood examination and/or positive hemoculture, *i.e.*, isolation and characterization of *T. cruzi* from blood in axenic medium; Prevalence of small wild mammals with positive *T. cruzi* serological assay was based on the detection of specific anti-*T. cruzi* antibodies in the IFAT. (DOC)

Acknowledgments

The authors thank Carlos Ardé and Marcos Antônio dos Santos Lima for technical support. We offer special thanks to Dr. Paulo Sérgio D'Andrea for his technical support in data collection and to Dr. Vera Bongertz for many helpful comments on the English version of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SCCX LFCFS AMJ. Performed the experiments: SCCX VSL KJLM. Analyzed the data: SCCX ALRR VSL JCRO LFCFS AMJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: LFCFS AMJ. Wrote the paper: SCCX ALRR AMJ. Participated in data collection: ALRR AMJ SCCX.

- Pineda V, Saldaña A, Monfante I, Santamaria A, Gottdenker NL, et al. (2011) Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet Parasitol* 178(3–4): 360–363.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, et al. (2007) Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134: 69–82.
- Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Anez N (2006) Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop* 98: 247–254.
- Estrada-Franco JG, Bhatia V, Az-Albiter H, Ochoa-García L, Barbabosa A, et al. (2006) Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg Infect Dis* 12: 624–630.
- Shadomy SV, Waring SC, Martins-Filho OA, Oliveira RC, Chappell CL (2004) Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 313–319.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SC, Mangia RH, Fernandes O, et al. (2005) *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 379–388.
- Pavlovsky EN (1939) Natural nidity of transmissible diseases. Moscow: Peace Publishers.
- Bavia ME, Carneiro DDMT, Gurgel HDC, Madureira Filho C, Barbosa MGR (2005) Remote sensing and geographic information systems and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Parasitologia* 47: 165–169.
- Burrough PA, Frank AU, eds. Geographic Objects with Indeterminate Boundaries. Gisdata II. European Science Foundation. Bristol: Taylor & Francis. 345 p.
- Borges-Pereira J, Sarquis O, Zauza PL, Britto C, Lima MM (2008) Epidemiology of Chagas disease in four rural localities in Jaguaruana, State of Ceará. Seroprevalence of infection, parasitemia and clinical characteristics. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(4): 345–351.
- Shaw J, Lainson R, Fraiha H (1969) Epidemiology of the first autochthonous case of Chagas' disease recorded in Belém, Pará, Brazil. *Rev Saúde Publ* 3: 153–157.
- Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen AM (2007) Effects of habitat fragmentation on wild mammals infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 134: 1785–1793.
- Herrera HM, Rademaker V, Abreu UG, D'Andrea PS, Jansen AM (2007) Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop* 102: 55–62.
- Camargo ME (1966) Fluorescent antibody test for the serodiagnoses of American Trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 227–234.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM (1999) Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by

- polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop* 72(2): 203–212.
32. Tomlin D (1990) *Geographic Information System and Cartographic Modeling*. Prentice Hall, New York.
 33. McCullagh P, Nelder JA (1989) *Generalized linear models*. 2ª edição. London: Chapman & Hall.
 34. Burnham KP, Anderson DR (2002) *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach*. New York: Springer.
 35. Burnham KP, Anderson DR (2004) Multimodel inference - understanding AIC and BIC in model selection. *Sociol Methods Res* 33(4): 261–304.
 36. R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
 37. Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butrón V, Uber-Busek S, Guerra HL, et al. (2008) Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro 103(5): 423–430.
 38. Noya BA, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, et al. (2010) Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas. *Venezuela J Infect Dis* 201(9): 1308–1315.
 39. Cohen JE, Gürtler RE (2001) Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science* 293(5530): 694–698.
 40. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol* 30: 1395–1405.

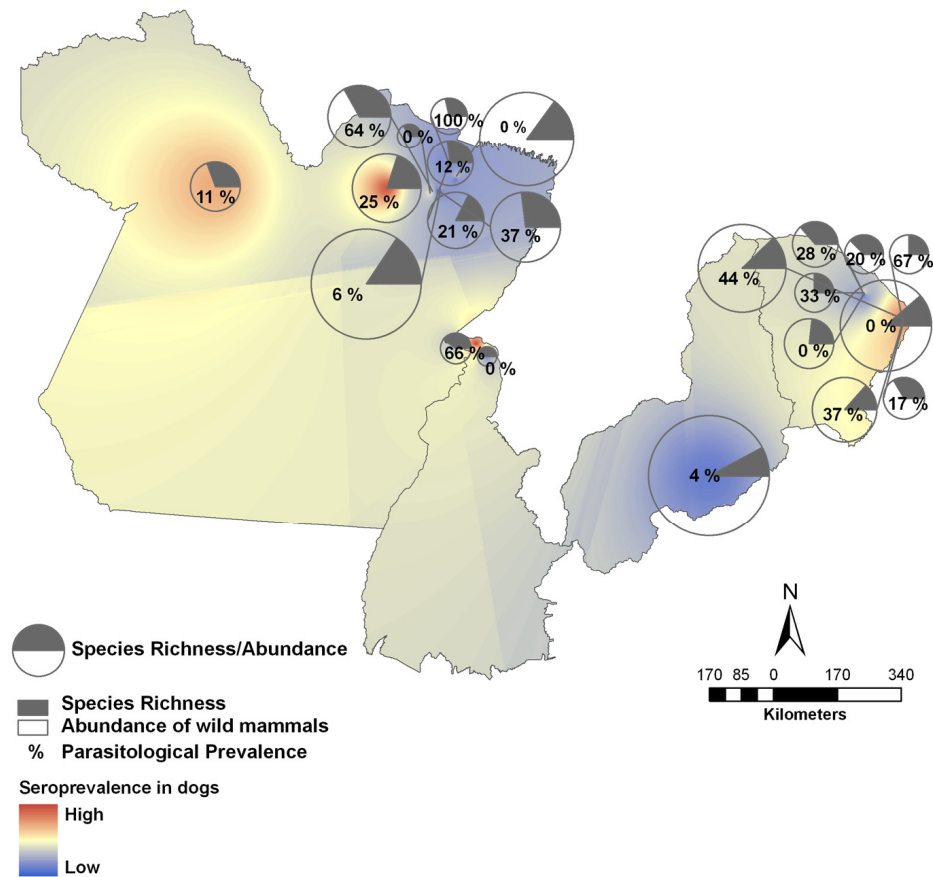


Figure S1. Mapping of distribution of parasitological prevalence, richness and abundance of small wild mammals. Geospatial analysis showed that the lower richness of the mammal fauna (richness and abundance) was associated with higher parasitemia in small wild mammals and higher exposition of dogs to infection.

Table S1: Prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* in small wild mammals: Caatinga, Amazon Forest and Pantanal.

Small Wild Mammals					
Biome/State	Municipalities	Localities	Species Richness	IFAT +/Total (%)	Hemoculture +/Total (%)
Caatinga	Jaguaruana	Caatinguinha	5	20/36 (55)	16/36 (44)
Ceará		Córrego das Melancias	3	14/19 (77)	7/19 (37)
		Dió	3	2/6 (33)	1/6 (17)
		Perímetro Irrigado	2	2/2 (100)	1/2 (50)
		Figueiredo do Bruno/do Ivan	2	5/6 (83)	4/6 (67)
	Redenção	Salobro	3	7/10 (70)	0/10
		Alto Cassiano	4	5/7 (71)	2/7 (28)
		Manoel Dias	2	3/6 (50)	2/6 (33)
		Sítio Outeiro	3	4/5 (80)	1/5 (20)
	Russas	Cipó	5	8/39 (20)	0/39
Piauí	João Costa		6	12/71 (17)	3/71 (4)
Amazon Forest					
Tocantins	Augustinópolis	2000	0	-	-
		São Roque	2	3/3 (100)	2/3 (66)
	Esperantina	São Francisco	0	-	-
	Axixá do Tocantins	Lagoa de São Salvador	0	-	-
		Piquizeiro	2	1/1 (100)	0/1
Pará	Abaetetuba	Ajuai	6	8/14 (57)	9/14 (64)
		Genipauba	6	12/19 (63)	7/19 (37)
		Panacaeira	1	0/2	0/2
		Urban Area	8	15/54 (28)	3/54 (6)
	Belém	Jurunas	0	-	-
		Val de Cans	6	24/40 (60)	0/41
	Cachoeira do Arari	Aranaí	2	4/5 (80)	5/5 (100)
		Furinho	3	3/14 (21)	3/14 (21)
		Mata Fome	3	3/8 (37)	1/8 (12)
		Sede Furo Grande	0	-	-
	Curralinho	São José da Povoação	5	6/20 (30)	5/20 (25)
	Monte Alegre	setor 11	4	2/9 (22)	1/9 (11)
Pantanal					
Mato Grosso do Sul	Corumbá	Farms	17	31/95 (32)	35/221 (16)
				81/206 (39)	42/206 (20)

Footnotes: IFAT - Indirect Immunofluorescence Antibody Test

1-Data published in [22]

2-Data published in [2]

Legend:

Richness indicates the number of species captured in each area; Prevalence of small wild mammals with positive *T. cruzi* parasitological assays includes mammals that displayed: flagellates with typical *T. cruzi* morphology in fresh blood examination and/or positive hemoculture, *i.e.*, isolation and characterization of *T. cruzi* from blood in axenic medium; Prevalence of small wild mammals with positive *T. cruzi* serological assay was based on the detection of specific anti-*T. cruzi* antibodies in the IFAT.

Discussão Geral

Mais de 100 anos após ter sido reconhecido pelo próprio Carlos Chagas ser a doença de Chagas primariamente uma enzootia silvestre, muitos aspectos do ciclo enzoótico ainda são pouco conhecidos. Entre estes, as variáveis que modulam a transmissão das diferentes subpopulações de *T. cruzi* que como se sabe, ocorrem em ciclos complexos, que podem ou não se sobrepor mesmo em um único estrato florestal. Baseado em marcadores moleculares são identificados atualmente seis distintos genótipos do parasito, TcI a TcVI, cujos padrões de distribuição na natureza e importâncias ecológica e epidemiológica apresentam ainda numerosas lacunas que precisam ser conhecidas.

No Brasil, já foram descritas as seis unidades discretas de tipagem (Discrete Typing Units – DTU), respectivamente TcI a TcVI, (Zingales et al. 2009; 2012), mas sua distribuição na natureza, hospedeiros e reservatórios e, principalmente, seu potencial risco para a doença humana ainda é pouco conhecido. Estas lacunas ocorrem provavelmente pela própria dificuldade do trabalho de coleta no campo que resulta em subamostragem e, portanto, em uma visão incompleta do padrão de dispersão destes genótipos.

Sabe-se que a DTU TcI é amplamente dispersa e frequente na natureza com amplo espectro de hospedeiros mamíferos e vetores, sendo considerado o principal agente da doença de Chagas no norte da bacia Amazônica (Monteiro et al. 2012). As DTUs TcIII e TcIV, antes classificados como um único grupo Z3, tem sido descritas como quase exclusivamente associados à hospedeiros silvestres, em ciclos de transmissão mais restritos e focais. Da distribuição dessas DTUs no Brasil pode-se afirmar que são menos frequente que TcI e TcII e que eram descritas como raramente de importância na infecção humana. Entretanto, na Amazônia atualmente tem-se observado surtos DCA por via oral causadas pelas DTUs TcIII e TcIV (Valente et al. 2009; Marcili et al. 2009a,b; Monteiro et al. 2012).

Neste primeiro artigo nós focamos na dispersão das DTUs TCIII e TCIV de *T. cruzi*, que durante a publicação deste artigo foram classificadas como Z3 (na época da publicação não tínhamos implementado a genotipagem em DTUs), uma vez que a distribuição dessas DTUs eram descritas como mais prevalentes na Amazônia e responsáveis pelos casos de doença de Chagas na região. Para tanto, nós

recentemente completamos a genotipagem à nível de DTU (metodologia atualmente implementada no laboratório) de cinco isolados desse estudo e outros dez isolados obtidos de vetores e mamíferos silvestres de excursões subsequentes. O método utilizado foi o PCR-RFLP do fragmento de 650 bp do gene histona 3 (H3), submetido à digestão pela enzima de restrição Alul (Westenberger et al. 2005).

A determinação das DTUs desses 15 isolados mostrou que o TcIV foi encontrado em 10 dos 15 isolados, em um largo espectro de hospedeiros mamíferos que incluiu 8 espécies distribuídas em 5 ordens de mamíferos (Rodentia, Marsupialia, Artiodactyla, Carnivora e Cingulata) e em dois exemplares de triatomíneos da espécie *Triatoma brasiliensis*. Um dos isolados caracterizado era proveniente de um *Dasypus novemcinctus* da área do surto de DCA ocorrido em Cachoeira do Arari/PA (2006). Vale ressaltar que, até a presente data não foi possível comparar os nossos dados com os dados referentes aos isolados de humanos da mesma área, pois ainda não foram publicados. Esses resultados mostram que esta DTU TcIV é capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros silvestres que até então eram descritos como pouco conhecidos provavelmente, resultado de subamostragem (Marcili et al. 2009b). De fato, talvez a dificuldade representada pelo trabalho com animais silvestres seja uma das causas que levam a maioria dos trabalhos a incluírem em seus estudos majoritariamente o gênero *Didelphis* que é frequentemente mencionado como espécie silvestre e não sinantrópico que de fato é. Monteiro e colaboradores (2012) analisando isolados proveniente de dois surtos na Amazônia, identificaram TcIV em todos os isolados de humanos e em 4/36 isolados de triatomíneos, mas todos os isolados provenientes de mamíferos silvestres foram genotipados como TcI.

A contribuição principal desse trabalho foi desvendar alguns dos mamíferos reservatórios de TcIV que até o presente momento eram pouco conhecidos (Marcili et al. 2009b; Monteiro et al. 2012).

A DTU TcIII também foi encontrada em 5 dos 15 isolados derivados de 4 espécie de 3 ordens de mamíferos (Marsupialia, Carnivora e Cingulata) e um triatomíneo da espécie *Rhodnius pictipes*, proveniente da área de surto de DCA ocorrido no município de Cachoeira do Arari/Pará em 2006. Dados da literatura (Monteiro et al.2012, Marcili et al. 2009a,b) somados aos nossos dados reforçam a circulação das DTUs TcIII e TcIV em área de surto de DCA na Amazônia.

Nossos dados mostram o oposto ao que os estudos prévios das DTUs TcIII e TcIV conduzidos principalmente na região norte do país mostraram, que foi a DTU TcIII sendo capaz de infectar um espectro de hospedeiros mamíferos mais amplo do que TcIV e sua associação restrita a ordem Cingulata (Yeo et al. 2005; Llewellyn et al. 2009).

Nossos resultados mostram ainda, que as DTUs TcIII e TcIV estão amplamente dispersas na natureza uma vez que foram encontradas em cinco dos seis biomas brasileiros e que são capazes de infectar seis das oito ordens de mamíferos que *T. cruzi* é capaz de infectar (Rodentia, Marsupialia, Artiodactyla, Carnivora e Cingulata e Chiroptera) e duas espécies de triatomíneos (*Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius pictipes*) em biomas com características eco-epidemiológicas distintas. Aqui estamos demonstrando pela primeira vez a amplitude da distribuição geográfica e de hospedeiros das DTUs TcIII e TcIV no Brasil.

Apesar de não ter genotipado à nível de DTU todos os isolados deste estudo, fica claro que as DTUs TcIII e TcIV são capazes de infectar igualmente uma ampla diversidade de mamíferos tanto quanto TcI e TcII, mas provavelmente com diferentes estratégias de transmissão em ciclos mais restritos e focais na natureza. Assim, a maneira como o homem interage e se expõe ao ambiente pode resultar no contato com as diferentes linhagens de *T. cruzi* e em potencial risco para a doença humana. Esses resultados que estão sendo preparados para publicação, comprovam pela primeira vez a ampla distribuição geográfica de hospedeiros mamíferos desses genótipos no Brasil.

O perfil epidemiológico da doença de Chagas vem adquirindo novos contornos e, conseqüentemente, vem exigindo um novo olhar e o delineamento de novas medidas de vigilância e controle. De fato, os surtos e casos de doença de Chagas aguda (DCA), que vem acontecendo em diversas regiões do país principalmente na Amazônia, constituem um cenário epidemiológico bem distinto da clássica transmissão vetorial contaminativa intradomiciliar por *Triatoma infestans* que a Iniciativa do Cone Sul com muito êxito, logrou controlar. Este novo recorte é desafiador devido às diferenças nos cenários regionais onde ocorre em paralelo com as peculiaridades de *T. cruzi*. Os surtos recorrentes vêm demonstrando que ainda não se adotou medidas de controle efetivas dentro deste atual perfil epidemiológico. É aqui que se insere este segundo artigo, neste novo perfil, e como variáveis do

ciclo enzoótico poderiam sinalizar um possível risco epidemiológico e indicativo de áreas quentes de transmissão de *T. cruzi*. A necessidade de um novo olhar sobre o ciclo enzoótico de transmissão nos levou a um estudo abrangente incluindo variáveis paisagísticas além de aspectos biológicos e ecológicos da diversidade de espécies animais que constituem a rede trófica na qual está incluído *T. cruzi* em áreas onde aconteceram os casos de DCA.

Para tanto, nós avaliamos a composição faunística de pequenos mamíferos silvestres como possível bioindicador de áreas com altas taxas de transmissão de *T. cruzi* e conseqüentemente de risco epidemiológico de DCA na Amazônia. A importância do monitoramento de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) silvestres como bioindicadores de parasitos multi-hospedeiros, reside no fato que esses animais são abundantes, tem alta taxa de reposição e, quando susceptíveis a infecção por um dado parasito, podem sinalizar um ciclo enzoótico robusto de transmissão de *T. cruzi* no ambiente. Além disso, podem refletir as alterações em suas taxas de prevalência/incidência da infecção atuando, dessa forma, como sentinelas da transmissão e possível risco. Para tanto, selecionamos o município de Abaetetuba onde são registrados casos recorrentes de doença de Chagas Aguda (DCA) e é o segundo município em número de casos, logo depois de Belém. Entre 2006 e 2011 foram registrados em média mais de 10 casos de DCA por ano. Recentemente, em agosto de 2012, foi registrado um surto envolvendo 24 casos (SESPA).

Neste contexto, para melhor compreender este cenário epidemiológico, estudamos o ciclo de transmissão enzoótico de *T. cruzi* em três localidades do município de Abaetetuba (Genipaúba, Ajuai e área urbana) com distintos níveis de alteração da paisagem.

Nossos resultados mostraram que não houve diferenças na soroprevalência e composição da fauna de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos entre as áreas. Entretanto, observamos diferenças nas taxas de hemocultivos positivos (potencial de transmissibilidade de *T. cruzi*) entre os pequenos mamíferos, que variou significativamente de acordo com o grau de alteração da paisagem das áreas.

A localidade Ajuai classificada como área intermediária em termos de alterações de paisagem foi a localidade que apresentou as maiores taxas de animais com hemocultivos positivos. Portanto, a ação antrópica na natureza altera o ciclo de

transmissão silvestre podendo refletir uma maior competência de transmissão do parasito em determinadas áreas e, conseqüentemente, em maior risco. Esses dados mostram que a interação parasita-hospedeiro é dinâmica, multifatorial e modifica-se conforme as condições ambientais naturais e conseqüentemente com a utilização da paisagem pelo homem. Portanto, a possibilidade de seres humanos e mamíferos domésticos entrarem em contato com insetos infectados variam em escala local. Ou seja, não se pode extrapolar as mesmas medidas epidemiológicas sem levar em consideração as diferenças micro ambientais de cada área. Este é especialmente o caso da Amazônia, um mosaico de paisagens cada qual com sua particularidade. Assim, deve ser levado em consideração na definição de áreas de risco as características da micro-regionalidade de cada área.

Uma vez que não foi possível correlacionar a composição da fauna de pequenos mamíferos e suas taxas de infecção por *T. cruzi* com o padrão de alteração da paisagem das três localidades do município de Abaetetuba, estendemos o estudo para mamíferos domésticos (cães e porcos). Observamos que estes estavam infectados, por *T. cruzi*, como indicado por sorologia positiva. A soroprevalência que reflete a exposição dos cães para *T. cruzi*, foi a única característica comum entre as localidades estudadas, incluindo áreas com surto, ressaltando a importância de selecionar mamíferos domésticos como sentinelas na identificação de áreas com alto risco de transmissão de *T. cruzi*. Observamos que em Ajuái, localidade com as mais altas taxas de infecção por *T. cruzi* em mamíferos silvestres, os cães foram mais expostos à infecção. Portanto, sinalizando que a última barreira entre o ciclo de transmissão silvestre e a área de atuação do homem foi transposta, ou seja, existe risco de infecção deste, reforçando a importância dos animais domésticos como sentinelas de risco epidemiológico. Foi aqui que começamos a aprofundar os estudos sobre a participação dos cães como sentinela de áreas de risco de transmissão de *T. cruzi* ao homem. Este tipo de estratégia já foi proposto e utilizado na Argentina, Venezuela, México, Panama e Brasil (Estrada-Franco et al. 2006; Crisante et al. 2006; Gurtler et al. 2007; Roque et al. 2008; Pineda et al. 2011; López-Céspedes et al. 2012; Rocha et al. 2012).

De fato, temos observado que, embora todas as áreas onde ocorreram os surtos apresentem muitas particularidades no que se refere ao ciclo de transmissão entre animais silvestres, tipo de vegetação, uso da terra, clima, relevo, os animais

domésticos estão sempre expostos à infecção (Roque et al. 2008; Jansen e Roque, 2010). Adotar o sistema de animal sentinela surge como uma possibilidade eficiente de se determinar quais áreas implementar o manejo integrado com vistas a evitar novos casos (Roque e Jansen, 2008).

Assim, como observamos que a soroprevalência de cães proveniente de áreas de surto de DCA é maior ou igual a 30%, sugerimos a implementação de um Cut Off a partir de 30% de soroprevalência dos cães como fator de risco epidemiológico de DCA, sinalizando a necessidade de intervenção da vigilância epidemiológica na área. Ou seja, o monitoramento dos animais domésticos pode e deve ser utilizado como uma primeira medida no diagnóstico de áreas de risco.

Mapas de distribuição dos fatores determinantes de risco epidemiológico constituem uma base para a identificação de áreas de risco em termos de transmissão de doenças e parasitoses para o planejamento de campanhas de saúde e intervenções epidemiológicas direcionadas (Bryssinckx et al. 2012). Abordagem de análise geoespacial vem sendo aplicada para estudar, explicar e prever padrões espaço-temporais de doenças, fatores de risco, incluindo fatores biológicos, ambientais, sociais e econômicos e suas interações (Kitron et al. 2006, Silva et al. 2011).

Aqui nós aplicamos a técnica de interpolação espacial, a fim de modelar, em superfícies contínuas a variação espacial dos atributos para áreas não amostradas. Em conjunto com a aplicação de álgebra de mapas sobre os resultados da interpolação foi proposta uma abordagem alternativa ao trabalho de Costa (2007) para gerar mapas baseados na teoria da lógica Fuzzy.

Neste terceiro artigo nós avaliamos o potencial da análise geoespacial pelos métodos de interpolação e álgebra de mapas como uma ferramenta para a construção de mapas para identificar área e fatores de risco de doença de Chagas. Para tanto, foram avaliadas e comparadas diferentes taxas de prevalências no que se refere a transmissão de *T. cruzi* em três biomas brasileiros, Amazônia, Caatinga e Pantanal, incluindo áreas logo após a ocorrência de surtos de DCA e antigas áreas endêmicas que ainda apresentam altas taxas de infecção em vetores e mamíferos, mas sem o registro de casos humanos. Foram avaliados também os impactos de simplificação da fauna de pequenos mamíferos silvestres na prevalência da infecção por *T. cruzi* em cães.

A análise exploratória comparando os mapas temáticos gerados através da técnica de interpolação pelo método Quadrado do Inverso da Distância (IDW) mostrou uma correlação inversa da distribuição da infecção por *T. cruzi* em cães e uma diminuição da diversidade e abundância de espécies de pequenos mamíferos silvestres. Esta evidência de correlação espacial foi confirmada pela álgebra de mapas, mostrando que áreas que apresentam maior diversidade de espécies de pequenos mamíferos, os cães estão menos expostos a infecção por *T. cruzi*. Uma correlação direta foi observada em áreas com ciclo de transmissão robusto e ativo, como demonstrado pelas altas prevalências de hemoculturas positivas nos pequenos mamíferos silvestres, os cães estavam mais expostos a infecção por *T. cruzi*. Além de definir a distribuição espacial de doenças, a modelagem assim concebida pode ser usada para prever o risco e ser extrapolada para outras áreas com características semelhantes onde os dados de amostragem não tenham sido obtidos (Mischler et al. 2012). Essa ferramenta vem sendo usada na identificação de áreas com diferentes graus de risco para alocação de recursos diferenciados para a vigilância de doenças, controle e educação (Mischler et al. 2012).

Uma segunda abordagem baseada em análise estatística utilizando o Modelo Linear Generalizado (GLM) foi realizada para que fossem validados os resultados da análise geoespacial. Na análise estatística, foram encontradas evidências de que as co-variáveis riqueza de espécies de pequenos mamíferos e taxa de hemocultivo positivo influenciam na média da infecção por *T. cruzi* em cães. Portanto, em áreas que apresentam maior riqueza de pequenos mamíferos silvestres, a soroprevalência dos cães era menor, além da relação direta das áreas com alta taxa de hemocultivo positivo entre mamíferos silvestres e cães com altas taxas de soroprevalência. Nossos resultados mostram que cães de áreas de surto de doença de Chagas (DCA) estão mais expostos (indicada pela taxa de soroprevalência) à infecção por *T. cruzi*. A abordagem da modelagem estatística já vem sendo aplicada na definição de fatores e áreas de risco e dispersão de vetores (Abad-Franch et al. 2010; Barbu et al. 2010; Leite et al. 2011; Scholte et al. 2012).

O método de interpolação demonstrou ser eficaz ao estimar áreas de risco de transmissão de *T. cruzi*. A interpolação espacial também mostrou ser uma ferramenta que pode ser utilizada quando se precisa extrapolar os resultados dos dados amostrados em escala local e municipal. Os nossos resultados confirmam o

potencial da aproximação, produzindo simulações realísticas da dinâmica do processo mapeado demonstrado por Dragicevic e Marceau (2000).

Métodos precisos para estimar a distribuição espaço-temporal de áreas de risco são, portanto, especialmente necessários no estudo de parasitos multi-fatoriais como o caso de *T. cruzi*. No entanto, as ferramentas para construção de mapas de estimativas e predição na definição de áreas de risco são muitas vezes baseadas em presença ou ausência de fatores de risco sem levar em consideração a interação entre esses fatores e possíveis consequências desta interação. Entretanto, quando este passo é precedido por uma interpolação espacial para estimar valores ausentes em áreas não-amostradas, a precisão é melhorada consideravelmente (Bryssinckx et al. 2012).

Diante dos resultados alcançados com os primeiros protótipos dos mapas fuzzy gerados pelo método de interpolação espacial/álgebra de mapas, é apresentada uma nova abordagem referente à análise multicritério com apoio da lógica fuzzy. Trata-se de uma lógica matemática que permite a atribuição de valores de aptidão para as variáveis utilizadas, indo além da lógica binária (booleana) que admite apenas duas possibilidades, o verdadeiro e o falso. A lógica fuzzy aceita outros níveis de aptidão que estão na transição entre o sim e o não, podendo ser considerado um talvez.

O mapeamento booleano determina um limite entre classes mapeadas, onde as áreas de transição não são representadas. Assim uma maneira possível de representar áreas de transição e aumentar a precisão na identificação de diferentes graus de risco é através da aplicação da técnica de interpolação espacial (Bryssinckx et al. 2012). Segundo as modelagens booleana (abruptas) e fuzzy (graduais) as incertezas nos valores dos atributos dos mapas causam erros nos resultados das inferências espaciais efetuadas. Os métodos booleanos estão muito mais sujeitos à propagação de erros do que os equivalentes fuzzy, e a utilização da técnica fuzzy pode reduzir a propagação de erros por meio de modelos lógicos, fornecendo cenários mais confiáveis (Burrough e Heuvelink, 1992 *apud* Moreira, 2001).

Na avaliação multicritério realizada por Liotte et al. (2006) para determinação de novas áreas para o desenvolvimento urbano, os autores compararam análises booleana e fuzzy. Na análise booleana, apenas ocorre a sobreposição destes

fatores resultando em resposta rígida de sim ou não, ou seja, determinada área é apta para o desenvolvimento urbano e determinada área é inapta. Já ao utilizar-se a técnica de análise fuzzy cada fator pode ser descrito por uma função específica que melhor o descreva e, além disso, as combinações entre eles permitem uma variabilidade entre as classes onde não são apenas decisões rígidas de sim ou não, mas uma variabilidade entre as classes de aptidão ao desenvolvimento.

A Lógica fuzzy tem sido utilizada de forma crescente na modelagem de problemas sociais e ambientais devido a suas características peculiares, tais como a sua representação em graus de pertinência, fazendo com que as passagens entre os conjuntos fuzzy, alto, médio e baixo risco sejam suaves (esses contornos suaves retratam melhor as áreas e fatores modelados), sendo estes níveis representados pelos graus de pertinência existentes na teoria dos conjuntos fuzzy (Vasconcelos et al. 2010).

A abordagem de modelagem dos dados e mapeamento pela teoria da lógica fuzzy, já foi proposta e utilizada na avaliação de áreas com risco de exposição a radiação (Vasconcelos et al. 2010), avaliar o risco de morte neonatal (Nascimento e Ortega, 2002), construção de matriz de risco (Markowski e Mannan, 2008), identificação de áreas com risco de deslizamento de terra (Pradhan et al. 2009).

Esta metodologia também foi utilizada na África do Sul, na bacia do rio KwaZulu-Natal, para identificar áreas onde condições e fatores seriam favoráveis a ocorrência de cólera. Foi criado um sistema especialista e um mapa fuzzy da epidemia de cólera na região. A partir do modelo, foi possível identificar que a propagação subsequente de cólera depende principalmente dos fatores socioeconômicos (Fleming et al. 2007).

Nesse sentido, a teoria da lógica fuzzy permite um maior refinamento na modelagem dos dados, permitindo a representação da variação espacial dos atributos em superfícies contínuas. As funções de pertinência fuzzy possibilitaram a incorporação do conhecimento de forma bastante realista, resultando em cenários mais coerentes e menos sujeitos a erros (Moreira, 2001).

Nesse contexto, foi utilizado o método fuzzy de inferência espacial para a construção de um modelo de integração dos fatores determinantes do risco de DCA. Para tal, foi adotado um modelo prospectivo visando à definição de áreas de risco potencial de DCA em Abaetetuba e Belém, no estado do Pará. Esses resultados que

estão sendo preparados para publicação, comprovam pela primeira vez a aplicação da inferência fuzzy no mapeamento de áreas de risco, como suporte na tomada de decisão na vigilância epidemiológica de DCA.

Para tanto, foi construído um modelo fuzzy tipo Mamdani, usando o aplicativo MatLab (versão R2007b), baseado em base de regras para mapear as zonas de risco de doença de Chagas na região Amazônica. O modelo é composto por uma rede *fuzzy* de cinco camadas (A figura 19 ilustra o fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy para a avaliação do risco de transmissão de DCA, capítulo 4) e 30 inferências (tabela 2 capítulo 4), (as variáveis estão no fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy, mas o detalhamento das inferências está na tabela 2), englobando dados de casos de doença de Chagas, mamíferos, entomológicos, ambientais e meteorológicos. Inicialmente, os dados de entrada foram fuzificados em termos de conjuntos lingüísticos (alto, médio e baixo). Para cada variável de saída foram criados três conjuntos fuzzy (alto, médio e baixo risco). As variáveis de entrada e saída foram representadas por funções de pertinência tipo trapezoidais. A base de regra do modelo fuzzy tipo Mamdani foi formulada a partir do conhecimento de especialistas e dados da literatura. Os dados de saída, defuzificados pela técnica do centróide, foram normalizados em um intervalo definido de acordo com os valores máximos e mínimos definidos pelo especialista. Após estas etapas foi realizada a análise de sensibilidade do sistema no qual todas as inferências foram testadas para avaliação da contribuição de cada uma no modelo proposto e determinação dos valores de calibração. A análise de sensibilidade mostrou que o modelo fuzzy foi sensível à forma dos conjuntos fuzzy, do número de conjuntos fuzzy, da natureza das regras e das técnicas de validação usadas.

A modelagem do sistema foi concluída e validada em testes com dados de nove localidades distribuídas em dois municípios com casos e/ou surtos de DCA, Abaetetuba e Belém no Pará, e os resultados (A figura 19 ilustra o mapa fuzzy) indicam uma superfície com diferentes graus de risco determinando áreas de risco de transmissão por *T. cruzi*. A obtenção deste mapa, resultante da aplicação da inferência fuzzy aos dados fornecidos, reflete o conhecimento dos especialistas consultados. Dessa forma, foi possível identificar uma região de maior risco no mapa sendo coerente com os dados na literatura sobre a localização das regiões de maior

concentração em número de casos, as chamadas de áreas prioritárias da vigilância epidemiológica em DCA no estado do Pará (SESPA).

Os resultados mostraram que o modelo de risco de DCA fornece a possibilidade de trabalhar com as incertezas não-probabilísticas baseadas na teoria dos conjuntos fuzzy, permitindo a inclusão de variáveis não quantitativas no modelo, refletindo a realidade das áreas estudadas.

Os resultados sugerem que estes tipos de modelos fuzzy são altamente promissores para avaliação de áreas de risco de DCA. O mapa fuzzy representou bem a região de ocorrência de casos pela suavidade de seus contornos, que é inerente aos fundamentos da lógica fuzzy e coerente com o problema estudado, podendo ser uma ferramenta para dar suporte a tomada de decisão. Assim, os dados de saída obtidos podem ser utilizados para subsidiar a tomada de decisão na vigilância epidemiológica de DCA nestas áreas.

A modelagem pela lógica fuzzy permite incorporar no processo de avaliação o conhecimento multidisciplinar de especialistas. Apesar de representar uma quebra de paradigma em relação às metodologias de avaliação baseadas na lógica clássica, a teoria da lógica fuzzy facilita o diálogo entre o profissional de ciências exatas, responsável pela implementação computacional, e os especialistas das diversas áreas envolvidas, uma vez que permite a utilização de variáveis e expressões lingüísticas e de regras lógicas simples. Ressalta-se que a participação de um número maior de especialistas envolvidos na definição dos conjuntos fuzzy e na avaliação dos projetos resulta em respostas mais confiáveis (Garcia et al. 2007).

A definição de áreas prioritárias no manejo sustentável das ações de vigilância epidemiológica de doença de Chagas variou de acordo com a metodologia empregada. O método baseado na inferência fuzzy espacial demonstrou melhores resultados em relação a lógica booleana no mapeamento e identificação de áreas de risco, na representação contínua das variáveis e na facilidade de modelagem do processo de tomada de decisão, pelos especialistas, devido ao uso de variáveis lingüísticas e de inferências, definidas nas bases de regras. A lógica booleana não apresentou resultados satisfatórios, pela dificuldade de representar os diferentes atributos das paisagens em classes com intervalos contínuos o que, por sua vez, acarreta na perda de informação e, provavelmente, na geração de erros no processo de tomada de decisão. A rigidez do mapa final gerado no método booleano para o

mapeamento das áreas foi outra característica não favorável, não permitindo variações na graduação dos níveis de prioridade, para os processos de tomada de decisão. O método estatístico GLM utilizado como suporte as análises exploratórias visuais demonstrou ser uma ferramenta eficaz na definição de fatores de risco, porém sua limitação foi a não espacialização dos fatores utilizados na definição de áreas com proximidade às áreas sensíveis aos ambientes silvestres com ciclos de transmissão robusto de *T. cruzi*.

Conclusões

✓ Dos genótipos Z3 (DTUs TcIII e/ou TcIV) pode se afirmar que:

1. são mais amplamente distribuídas na natureza do que descritas até o momento (Amazônia, Caatinga, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica);

2. Apresentam amplo especto de hospedeiros mamíferos que incluem 12 espécies distribuídas em seis ordens (Rodentia, Marsupialia, Artiodactyla, Carnivora, Cingulata e Chiroptera).

✓ O ciclo enzótico de transmissão de *T. cruzi* é dinâmico, sazonal, multifatorial e modifica-se conforme as condições ambientais resultantes da utilização da paisagem pelo homem;

✓ A infecção por *T. cruzi* em cães mostrou ser sinalizadora de áreas com diminuição de diversidade e abundância de espécies de pequenos mamíferos silvestres com altas taxas de hemocultivo positivo;

✓ O uso de cão como animal sentinela mostrou ser uma ferramenta robusta na avaliação precoce do ciclo de transmissão de *T. cruzi* nas proximidades das habitações humanas;

✓ Programas de sensibilização e educação da população local devem ser implementados em áreas onde a soroprevalência de cães seja $\geq 30\%$;

✓ Abordagem baseada na inferência fuzzy espacial permitiu a representação contínua e integrada das variáveis envolvidas na transmissão de *T. cruzi* na natureza e a identificação de áreas prioritárias no manejo sustentável de ações de vigilância epidemiológica de DCA;

✓ A análise geoespacial (das variáveis infecção por *T. cruzi* em cães; diversidade, abundância e prevalências de hemoculturas e sorologia positivas de espécies de pequenos mamíferos silvestres) por meio da interpolação espacial e álgebra de mapas demonstrou ser eficaz na identificação de áreas de risco e consequentemente na definição de áreas estratégicas de ações de prevenção de novos casos de DCA.

Referências bibliográficas

- Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ, Aguilar HM, Miles MA. (2010). Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by Triatomine bugs at three spatial scales. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e620.
- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. (2007). Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(Suppl. I): 47-55.
- Aguirre AA. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*. 2(Suppl 1):S7.
- Altman, D (1994). Fuzzy set theoretic approaches for handling imprecision in spatial analysis. *International Journal of Geographical Information Systems*. v. 8, n. 3, p.271-289.
- Amendola M, Souza AL, Barros LC (2005). Manual do uso da teoria dos conjuntos fuzzy no MATLAB 6.5. manual apresentado no Ciclo de Palestras/2004, realizado na FEAGRI/UNICAMP. Disponível em: <http://www.ime.unicamp.br/~laeciocb/manual_fuzzy_matlab.pdf>. Acesso em: 13 de fev. 2008.
- Andrade SG. (1974). Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 3: 65-121.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 796-799.
- Anjos DS (2008). Classificação da curvatura de vertentes em Perfil via Thin Plate Spline e Inferência Fuzzy – Dissertação (Mestrado em Ciências Cartográficas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente: 96 f.
- Anonymous, (1999). Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 429-432.

- Araujo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM (2010). Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Experimental Parasitology* 127 (1): 308–312.
- Ashford, RW (1996). Leishmaniasis reservoir and their significance in control. *Clin Dermat* 14:523-532.
- Barbu C, Dumonteil E, Gourbière S (2010). Characterization of the Dispersal of Non-Domiciliated *Triatoma dimidiata* through the Selection of Spatially Explicit Models. *PLoS Negl Trop Dis* 4(8): e777. doi:10.1371/journal.pntd.0000777
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvao 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: 46–62.
- Bavia ME, Carneiro DDMT, Gurgel HDC, Madureira Filho C, Barbosa MGR (2005). Remote sensing and geographic information systems and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Parasitologia* 47: 165–169.
- Bavia ME, Hale LF, Malone JB, Braud DH, Shane SM (1999). Geographic information systems and the environmental risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 60: 566-572.
- Benini LC (2007). Estimacão da densidade de solos utilizando sistemas de inferência fuzzy. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronmicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 192p.
- Berke O (2004). Exploratory disease mapping: kriging the spatial risk function from regional count data. *International Journal of Health Geographics* 3:18.
- Biggeri A, Catelan D, Dreassi E, Lagazio C, Cringoli G (2004). Statistical models for spatial analysis in parasitology. *Parassitologia* 46: 75-78.
- Borges-Pereira J, Castro JA, Campos JH, Nogueira JS, Zanza PL, Cardoso MA, Britto C, Araújo A (2002). Estudo da infeco e morbidade da doença de Chagas

- no município de João Costa, Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35: 315-322.
- Brener Z (1971). Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 13: 171-78.
- Briceño-León R (2007). Chagas disease and globalization of the Amazon. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23, Sup 1: S33-S40.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, 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(2): 219-232.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 30(1):35-44.
- Bruns HT, Egenhofer MJ (1997). User Interfaces for Map Algebra *Journal of the Urban and Regional Information Systems Association.* 9(1): 44-54.
- Bryssinckx W, Ducheyne E, Muhwezi B, Godfrey S, Mintiens K, Leirs H, Hendrickx G (2012). Improving the accuracy of livestock distribution estimates through spatial interpolation. *Geospatial Health* 7(1), 101-109
- Burrough PA, Heuvelink GBM (1992). The sensitivity of boolean and continuous (Fuzzy) logical modeling to uncertain data. In: European Conference And Exhibition On Geographical Information Systems Munich (EGIS'92). Munich: EGIS'92, 1032-1041.
- Burrough PA. & McDonnell RA (1998). **Principles of Geographic Information Systems**. Oxford: Oxford University.
- Câmara G, Monteiro AM, FUKS S, Camargo E, Felgueira SC (2001). Análise Espacial de Dados Geográficos. 2º ed. [online]. Disponível: <http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro/analise/>.

Cambridge: The MIT Press.

Carrasco H, Frame I, Valente S, Miles M (1996). Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 54: 418-424.

Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Urdaneta-Morales S, Martínez C, Martínez CE, Garcia C, Rodríguez M, Espinosa R, Noya BA, Díaz-Bello Z, Herrera L, Fitzpatrick S, Yeo M, Miles MA, Feliciangeli MD (2012). Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis* 6(6): e1707. doi:10.1371/journal.pntd.0001707

Chaves LF, Hernandez MJ (2004). Mathematical modeling of American cutaneous leishmaniasis: incidental hosts and threshold conditions for infection persistence. *Acta Trop* 92: 245-252.

Costa, RO (2007). Representação cartográfica de fenômenos com limites indeterminados. Dissertação (Mestrado em Engenharia Cartográfica). Instituto Militar de Engenharia. 115 pg.

Coura JR, Junqueira ACV (2012). Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107(2): 145-154.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology*. 18(4): 171-176.

Coura JR, Viñas PA (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature. Chagas Disease Outlook*. June. S6-S7.

Coutinho CFS, Souza-Santos R, Lima MM (2012). Combining geospatial analysis and exploratory study of triatomine ecology to evaluate the risk of Chagas disease in a rural locality *Acta Trop* 121: 30– 33.

- Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Añez N (2006). Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 98, 247_254.
- D'alge, Júlio César Lima (2001) Introdução à Ciência da Geoinformação - Cartografia para Geoprocessamento, INPE, São José dos Campos, São Paulo. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro/introd/cap6-cartografia.pdf> 8.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 288: 2319-2320.
- Dias JCP (2006). Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39: 370- 375.
- Dias, JCP (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 11-18.
- Dobson A, Cattadori I, Holt RD, Ostfeld RS, Keesing F, Krichbaum K, Rohr JR, Perkins SE, Hudson PJ (2006). Sacred cows and sympathetic squirrels: The importance of biological diversity to human health. *PLoS Med* 3: e231.
- Dobson A, Foufopoulos J (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 356(1411):1001-1012.
- Dragicevic S; Marceau D J (2000). An application of fuzzy logic reasoning for GIS temporal modeling of dynamic processes. *Fuzzy Sets and Systems*, v.113, 69-80.
- Eastman JR (2001). Decision support: decision strategy analysis. Idrisi 32 release 2: Guide to GIS and image processing, v.2. Worcester: Clark Labs, Clark University, 22p.
- Estrada-Franco JG., Bhatia V, Az-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbosa A, Vazquez-Chagoyan JC, Martinez-Perez MA, Guzman-Bracho C, Garg N (2006). Human

- Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 624-630.
- Fernandes MC, Flannery AR, Andrews N and Mortara RA. (2012). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cell Microbiol* doi:10.1111/cmi.12090
- Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbell DA, 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 I): 195-197.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira ACV, Naiff RD, Barret TV, Degraeve W, Zingales B, Campbell, 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): 807-811.
- Fleming G, Van Der Merwe M, Mcferren G (2007). Fuzzy expert systems and GIS for cholera health risk prediction in southern Africa. *Environmental Modelling & Software*, v. 22, p.442-448.
- Flores-López CA, Machado CA (2011). Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(8): e1272.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2(3): e24
- Gao FH, Zhang SQ, Wang TP, Yu BB, He JC, Zhang GH, Wang H. 2011. Spatial analyses of distribution of schistosomiasis in Anhui Province. *Zhongguo Xue Xi Xiong Bing Fang Zhi Za Zhi.* 23(2):125-127.

- Garcia KC, Teixeira MG, Alves CC, Alves RN (2007). Concepção de um modelo matemático de avaliação de projetos de responsabilidade social empresarial (RSE). *Gest. Prod.*, São Carlos, v. 14, n. 3, p. 535-544.
- Garcia PAA, Melo PFF, Schirru R (2009). Aplicação de um modelo fuzzy DEA para priorizar modos de falha em sistemas nucleares. *Pesqui. Oper.* vol.29, n.2, pp. 383-402. ISSN 0101-7438.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR., Miles MA (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421, 936-939.
- Gil JF, Nasser JR, Cajal SP, Juarez M, Acosta N, Clmino RO, Diosque P, Krolewiecki AJ (2010). Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg.* 82: 433-440.
- Gorla DE (2002). Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecol. Austral.* 12, 117–127.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, A-Arroyo FC, Aufderheide A (2000). Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(4): 553-555.
- Gurtler 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: 69-82.
- Hadzilacos T (1996). On Layer-based Systems for Undetermined Boundaries. In:Geographic Objects with Indeterminate Boundaries, Burrough P. A. And Frank, A. U. (eds).Taylor & Francis.
- Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis.* 8(12): 1468-73.
- Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourão GM, Jansen AM (2008). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a

- reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(11):1133-1139.
- Herrera HM, Rocha FL, Lisboa CV, Rademaker V, Mourão GM, Jansen AM (2011). Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 380– 387.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM (2005). *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park “Serra da Capivara”, and its surroundings (PiauÍ, Brazil), endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 379–388.
- Jansen AM, Roque ALR (2010). Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. In: Jenny Telleria; Michel Tibayrenc. (Org.). American Trypanosomiasis, Chagas Disease - one hundred years of research. American Trypanosomiasis, Chagas Disease - one hundred years of research. 1ed. *Burlington*: Elsevier, v. 1, p. 249-276.
- Jansen AM, Santos de Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O (1999). The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (Suppl 1):203-204.
- Jimenez-Coello M, Acosta-Viana KY, Gusman-Marin E, Ortega-Pacheco A (2012). American Trypanosomiasis Infection in Fattening Pigs from the South-East of Mexico. *Zoonoses Public Health*. 59 (Suppl. 2): 166–169.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P (2008). Global Trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451 (21): 990-994.
- Katinsky M (1994). Fuzzy set modelling in Geographical Information Systems. MsC Thesis, University of Wisconsin-Madsin, USA.
- Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers¹¹ SS, Bogich T, Ostfeld RS (2010). Impacts of

- biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647–652.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett* 9: 485–498.
- Khan OA, Davenhall W, Ali M, Castillo-Salgado C, Vazquez-Prokopec G, Kitron U, Soares Magalhães RJ, Clements A (2010). Geographical information systems and tropical medicine. *Ann Trop Med Parasitol*. 104: 303-318.
- Kiang R, Adimi F, Soika V, Nigro J, Singhasivanon P, Sirichaisinthop J, Leemingsawat S, Apiwathnasorn C, Looareesuwan S (2006). Meteorological, environmental remote sensing and neural network analysis of the epidemiology of malaria transmission in Thailand. *Geospat Health*. 1: 71-84.
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P (2006). West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biol* 4: e82.
- Kitron U, Clennon JA, Cecere MC, Gürtler RE, Charles H. King CH, Vazquez-Prokopec G (2006). Upscale or downscale: applications of fine scale remotely sensed data to Chagas disease in Argentina and schistosomiasis in Kenya *Geospatial Health* 1, pp. 49-58.
- Kleinschmidt I, Bagayoko M, Clarke GP, Craig M, Le Sueur D (2000). A spatial statistical approach to malaria mapping. *Int J Epidemiol*. 29: 355-361.
- Lagacherie P, Andrieux P, Bouzigues R (1996). Fuzziness and Uncertainty of Soil Boundaries: From Reality to Coding in GIS. In: Geographic Objects With Indeterminate Boundaries, Burrough P. A. And Frank, A. U. (eds). Taylor & Francis.
- Lambert RC, Kolivras KN, Resler LM, Brewster CC, Paulson SL (2008). The potential for emergence of Chagas disease in the United States *Geospatial Health*. 2(2): 227-239.

- Leite GR, Santos CB and Falqueto A (2011). Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. *J. Biogeogr.* 38, 651–663
- 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): 1041-1049.
- Liotte SV, Macedo AB, Pedro MF (2006) Utilização de Técnicas de Geoprocessamento para apoio ao planejamento físico-territorial do município de Pariquera-Açu/SP, Disponível em: <<http://geolig.igc.usp.br/geoproc/pariquera/691.htm>>. Acesso em: novembro. 2012.
- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM (2006). Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology.* 133(Pt 5):603-11.
- Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, Vargas J, Torrico F, Miles MA, Gaunt MW (2009). *Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3(9): e510. doi:10.1371/journal.pntd.0000510.
- Longoni SS, López-Céspedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI, Marina C (2012). Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 35: 469– 476.
- López-Céspedes A, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI, Villegas N, Escobedo-Ortego J, Barrera-Perez MA, Sanchez-Moreno M, Bolio Gonzalez ME, Marin C (2012). Seroprevalence of Antibodies Against the Excreted Antigen Superoxide Dismutase by *Trypanosoma cruzi* in Dogs From the Yucatan Peninsula (Mexico). *Zoonoses and Public Health.* doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x

- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ (2004). *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(1): 1-12.
- Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AIR, Chiari E, Zingales B, Pena SDJ, Oliveira RP (2001). Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(3): 407-413.
- Malone JB, Bergquist NR, Huh OK, Bavia ME, Bernardi M, El Bahy MM, Fuentes MV, Kristensen TK, McCarroll JC, Yilma JM, Zhou XN (2001). A global network for the control of snail-borne disease using satellite surveillance and geographic information systems. *Acta Trop*. 79: 7-12.
- Manoel-Caetano FS, Silva AE (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública*. 23(10): 2263-2274.
- Marcili A, Lima L., Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira ACV, Souza AI, Rosa JA, Campaner M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Teixeira MMG (2009a). Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering Infection, *Genetics and Evolution* 9: 1265–1274
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira ACV, Maia da Silva F, Pinto AYN, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MMG (2009b). *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology*. 39: 615–623.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha E, Dias ES (2006). Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(1): 31-38, February 2006 31
- Markowski AS, Mannan MS (2008). Fuzzy risk matrix. *Journal of Hazardous Materials* 159: 152-157

- Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *B.M.J.* 326:1444-8.
- Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Povia M (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain. *Tras R Soc Trop Med Hyg.* 74:221-237.
- Mills JN, Childs JE (1998). Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance of human health. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 529-537.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (2011). Aspectos epidemiológicos/Casos de Doença de Chagas aguda, 2000–2010. Brasil, Fonte: SVS/MS, dados até, 2011. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt53145 4. Acessado 23/11/2012.
- Mischler P, Kearney M, McCarroll JC, Scholte RGC, Vounatsou P, Malone JB (2012). Environmental and socio-economic risk modelling for Chagas disease in Bolivia. *Geospatial Health* 6(3): S59-S66.
- Moncayo A (2003). Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(5): 577-591.
- 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. I): 17-30.
- Monteiro WM, Magalhães LK, Filho FSS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MG (2010). *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Tropical Medicine and International Health.* 15(9): 1049–1051.
- Monteiro WM, Magalhães LKC, Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJO, Borges L, Pires I, Guerra JAO, Silveira H, Barbosa MG (2012). *Trypanosoma cruzi* IV Causing

- Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *Plos One*. 7(7): e41284.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1861–1875. Doi: 10.1099/ijs.0.63081-0
- Moreira FRS (2001). Uso e Avaliação de Técnicas de Integração e Análise Espacial de Dados em Pesquisa Mineral Aplicadas ao Planalto de Poços de Caldas. 160 Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos - SP.
- Morel C, Chiari E Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6810-6814.
- Mortara RA, Andreoli WK., Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C and da SS (2008). Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell. Biochem.*, 47: 101-109.
- Najar AL e Marques EC (1998). *Saúde e Espaço*. Ed. Fiocruz.
- Nascimento LFC e Ortega NRS (2002). Fuzzy linguistic model for evaluating the risk of neonatal death Modelo lingüístico fuzzy para estimação do risco de morte neonatal. *Rev Saúde Pública* 36(6):686-92
- Nery-Guimarães F, da Silva NN, Clausell DT, de Mello AL, Rapone T, Snell T, Rodrigues N (1968). Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela–Rio Grande do Sul). *Hospital (Rio J)* 73: 73–110.
- Nicholson MC, Mather TN (1996). Methods for evaluating Lyme disease risks using geographic information systems and geospatial analysis. *J Med Entomol* 33: 711-720.

- Noireau F, Diosque P, Jansen AM (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res.* 40(2):26.
- Nuvolone D, Maggiore R, Maio, Fresco R, Baldacci S, Carrozzi L, Pistelli F, Viegi G (2011). Geographical information system and environmental epidemiology: a cross-sectional spatial analysis of the effects of traffic-related air pollution on population respiratory health. *Environmental Health*, 10:12
- Ocaña-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ (2010). Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e915.
- Ortega NRS (2001). Aplicação da teoria de conjuntos fuzzy a problemas da biomedicina. 2001. 152p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física. Universidade de São Paulo.
- Ostfeld RS, Keesing F (2000). The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool* 78: 2061–2078.
- PAHO — Pan-American Health Organization (2009). Doença de Chagas — guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. 92pp. Available in: http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guia_Doenca_Chagas_2009.pdf.
- Pande A, Williams CL, Lant ECL, Gibson DJ (2006). Using map algebra to determine the mesoscale distribution of invasive plants: the case of *Celastrus orbiculatus* *Parasitol Int* 56: 119–128.
- Paula SEM, Souza MJN (2007). Lógica Fuzzy como técnica de apoio ao Zoneamento Ambiental. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil, *INPE*. p. 2979-2984.
- Pedrycz W e Gomide F (1998). An Introduction to Fuzzy Sets – Analysis and Design,
- Pineda V, Saldaña A, Monfante I, Santamaría A, Gottdenker NL, Yabsley MJ, Rapoport G, Calzada JE (2011). Prevalence of trypanosome infections in dogs

- from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet Parasitol.* 178(3–4): 360–363.
- Pinto AY, Valente SA, Valente Vda C, Ferreira Junior AG, Coura JR (2008). Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(6):602-614.
- Pleydell DR, Raoul F, Tourneux F, Danson FM, Graham AJ, Craig PS, Giraudoux P (2004). Modelling the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection in foxes. *Acta Trop.* 91: 253-265.
- Pradhan B, Lee S, Buchroithner MF (2009). Use of geospatial data and fuzzy algebraic operators to landslide-hazard mapping. *Appl Geomat* 1:3–15.
- Raso G, Vounatsou P, Singer BH, N’Goran EK, Tanner M, Utzinger J (2006). An integrated approach for risk profiling and spatial prediction of *Schistosoma mansoni*-hookworm co-infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 6934-6939.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JÁ (2009). Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 (suppl 1): 152–158.
- Rassi AJ, Rassi A, Marin-Neto JÁ (2010). Chagas disease. *Lancet.* 375:1388-1402.
- Rocha FL, Roque ALR, Arrais RC, Santos JP, Lima VS, Xavier SCC, Cordeir-Estrela P, D’Andrea PS, Jansen AM (2012). *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology.* 1-11, *in press.*
- Roque ALR, D’Andrea PS, Andrade GB, Jansen AM (2005). *Trypanosoma cruzi*: distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol* 111: 37–46.

- Roque ALR, Jansen AM (2008). The importance of sentinel domestic animals to identify risk areas to the emergence of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(Supl III): 191-193.
- Roque ALR, Xavier SCC, Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM (2008) *Trypanosoma cruzi* Transmission Cycle Among Wild and Domestic Mammals in Three Areas of Orally Transmitted Chagas Disease Outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 9(5): 742–749.
- Rossi E, Rinaldi L, Musella V, Veneziano V, Carbone S, Gradoni L, Cringoli G, Maroli M (2007). Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospat Health*. 1: 191-198.
- Roux E, Venâncio AF, Girres JF, Romaña CA (2011a). Spatial patterns and eco-epidemiological systems – part II: characterising spatial patterns of the occurrence of the insect vectors of Chagas disease based on remote sensing and field data. *Geospatial Health* 6(1), pp. 41-52
- Roux E, Venâncio AF, Girres JF, Romaña CA (2011b). Spatial patterns and eco-epidemiological systems – part II: characterising spatial patterns of the occurrence of the insect vectors of Chagas disease based on remote sensing and field data. *Geospatial Health* 6(1), pp. 53-64.
- Ruhoff AL (2004). Gerenciamento de recursos hídricos – Modelagem ambiental com a simulação de cenários preservacionistas. Dissertação (Mestrado em Geomática). Santa Maria: UFSM p. 43.
- Ruhoff AL, Souza BSP, Giotto E, Pereira RS (2005). Lógica Fuzzy e Zoneamento ambiental da Bacia do Arroio Grande. *In: Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia, Brasil, INPE, p. 2355-2362.
- Salazar-Schettino PM, Bucio MI, Cabrera M, Bautista J (1997). First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 92: 499-502.

- Santana KSO, Bavia ME, Lima AD, Guimarães ICS, Soares ES, Silva MMN, Mendonça J, Martin MS (2011). Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil *Geospatial Health*. 5(2): 199-203.
- Schmidt KA, Ostfeld RS (2001). Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 82: 609–619.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 22(12):583-8.
- Scholte RGC, Carvalho OS, Malone JB, Utzinger J, Vounatsou P (2012). Spatial distribution of *Biomphalaria* spp, the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Geospat Health*. 6: S95-S101.
- Sciarretta A, Girma M, Tikubet G, Belayehun L, Ballo S, Baumgartner J (2005). Development of an adaptive tsetse population management scheme for the Luke community, Ethiopia. *J Med Entomol*. 42: 1006-1019.
- 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. Saúde Pública* 3: 153-157.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB (2012). Oral Transmission of Chagas Disease. *Emerging Infections*. 54: e845.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JCP, Neto VA, Tolezano JE, Peres BA, Arruda ER, Lopes MH, Shiroma M, Chapadeiro E (1991). Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 33:351–7.
- Silva AVM, Magalhães MAFM, Brazil RP, Carreira JCA (2011). Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in na endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. *Geospatial Health* 6(1), 33-40
- Silva JX (2001). Geoprocessamento para análise Ambiental. Rio de Janeiro. 228p.

- Slimi R, El Yacoubi S, Dumonteil E, Gourbière S (2009). A cellular automata model for Chagas disease. *Applied Math Modelling* 33: 1072–1085.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 83: 141-152.
- Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, Moraes MH, Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TCM, Stoco PH, Murta SM, Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 60: 25–32.
- Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8): e1749. doi:10.1371/journal.pntd.0001749
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ, (1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas´disease: gential, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution.* 42:277-292.
- Tomlin CD (1983). "A Map Algebra." In Proceedings of the 1983 Harvard Computer Graphics Conference, Cambridge, MA.
- Tomlin CD (1990). "Geographic Information Systems and Cartographic Modeling." Englewood Cliff, NJ: Prentice-Hall.
- Tyler KM, Engman DM (2003). The life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA, eds. American trypanosomiasis. World class parasites: vol 7. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 1–11.
- Valente SAS, Valente VC, César MJB, Santos MP (1997). Registro de 15 casos autóctones de doença de Chagas no Estado do Amapá com evidências de transmissão oral. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXIII, Belo Horizonte, MG, Programa e Resumos dos Temas Livres e Posters. Tema Livre 056, 53.

- Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN, César MJB, Santos MP Miranda COS, Cuervo P, Fernandes O (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103: 291-297.
- Valente VC, Pinto AYN, Valente SAS (2000). Novo episódio familiar com 7 casos de doença de Chagas aguda e autóctone em Bagre Estado do Pará. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVI, São Luís, MA, TL 113, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 33(Supl.I):388-389,
- Vasconcelos WE, Lira CABO, Teixeira MG (2010). Development of a new fuzzy exposure model. *Progress in Nuclear Energy* 52 (2010) 273–277
- Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen AM (2007). Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 134: 1785-1793.
- Vazquez-Prokopec GM, Spillmann C, Zaidenberg M, Kitron U, Gürtler RE (2009). Cost-effectiveness of Chagas disease vector control strategies in north-western Argentina. *PLoS Negl Trop Dis*. 3: e363.
- Weiss RA, McMichael AJ (2004). Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Med*. 10: S70-S76.
- Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.
- Williams ES, Yuill T, Artois M, Fischer J, Haigh SA (2002). Emerging infectious diseases in wildlife. *Rev Sci Tech*, 21(1):139-157.
- World Health Organization (2002). Control of Chagas Disease: Second Report of the WHO Expert Committee. UNDP/World Bank/WHO, Geneva.
- Xavier SCC, Vaz VC, D'Andrea PS, Herrera L, Emperaire L, J.R. Alves, 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: 119–128.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GAJ, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, 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: 225-233.
- Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS (2011). Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites *Trends in Parasitology*. 27(10): 459-466.
- Zadeh LA (1965). Fuzzy Sets. *Information and Control*. v.8, p.338-353.
- Zhang ZY, Xu DZ, Zhou XN, Zhou Y, Liu SJ (2005). Remote sensing and spatial statistical analysis to predict the distribution of *Oncomelania hupensis* in the marshlands of China. *Acta Trop*. 96: 205-212.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiaris E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(7): 1051-1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*. 12: 240–253

Anexo 1. Modelo fuzzy de inferência espacial na determinação de áreas de maior risco de DCA

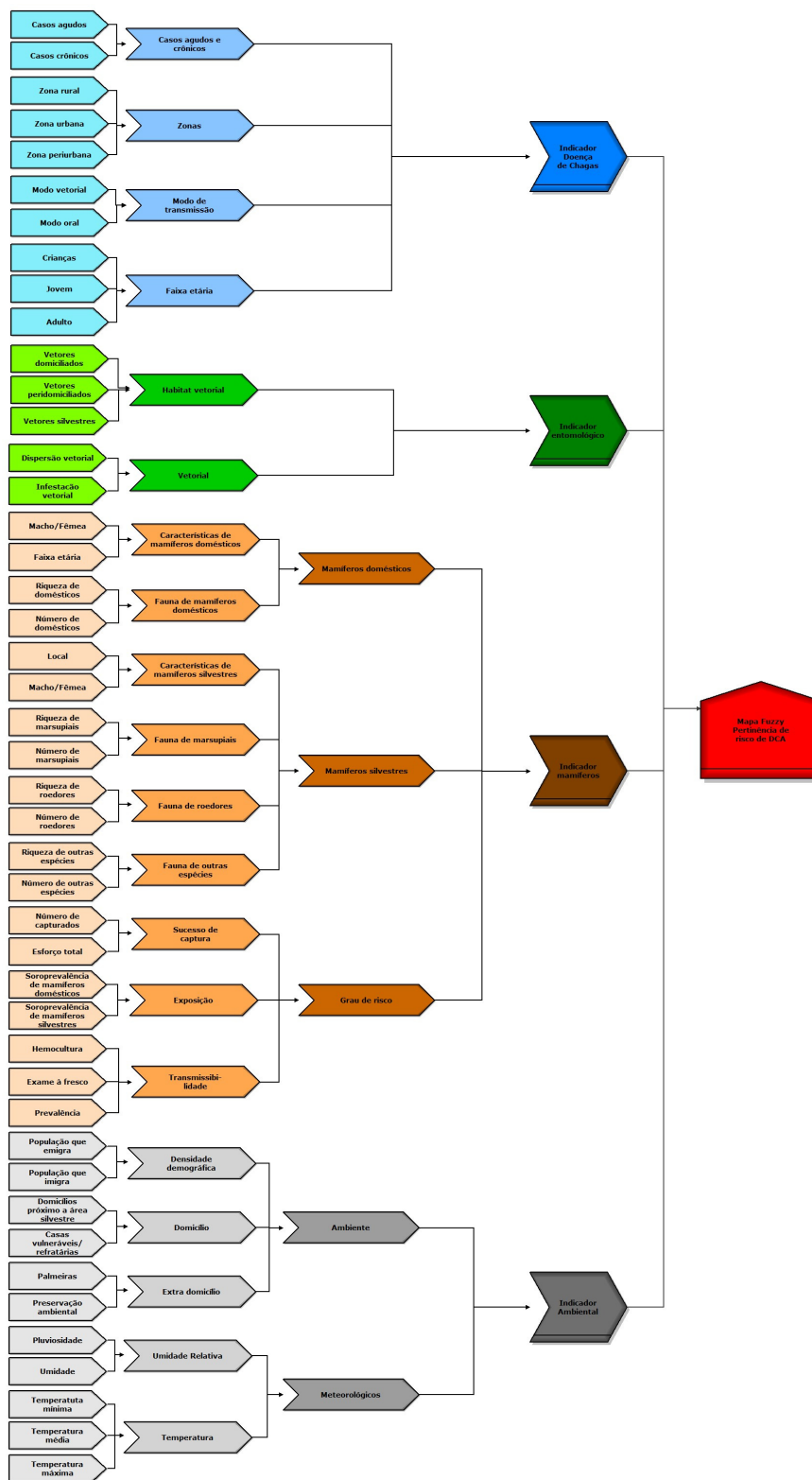


Figura 19. Fluxograma geral da estrutura hierárquica fuzzy para a avaliação do risco de transmissão de DCA

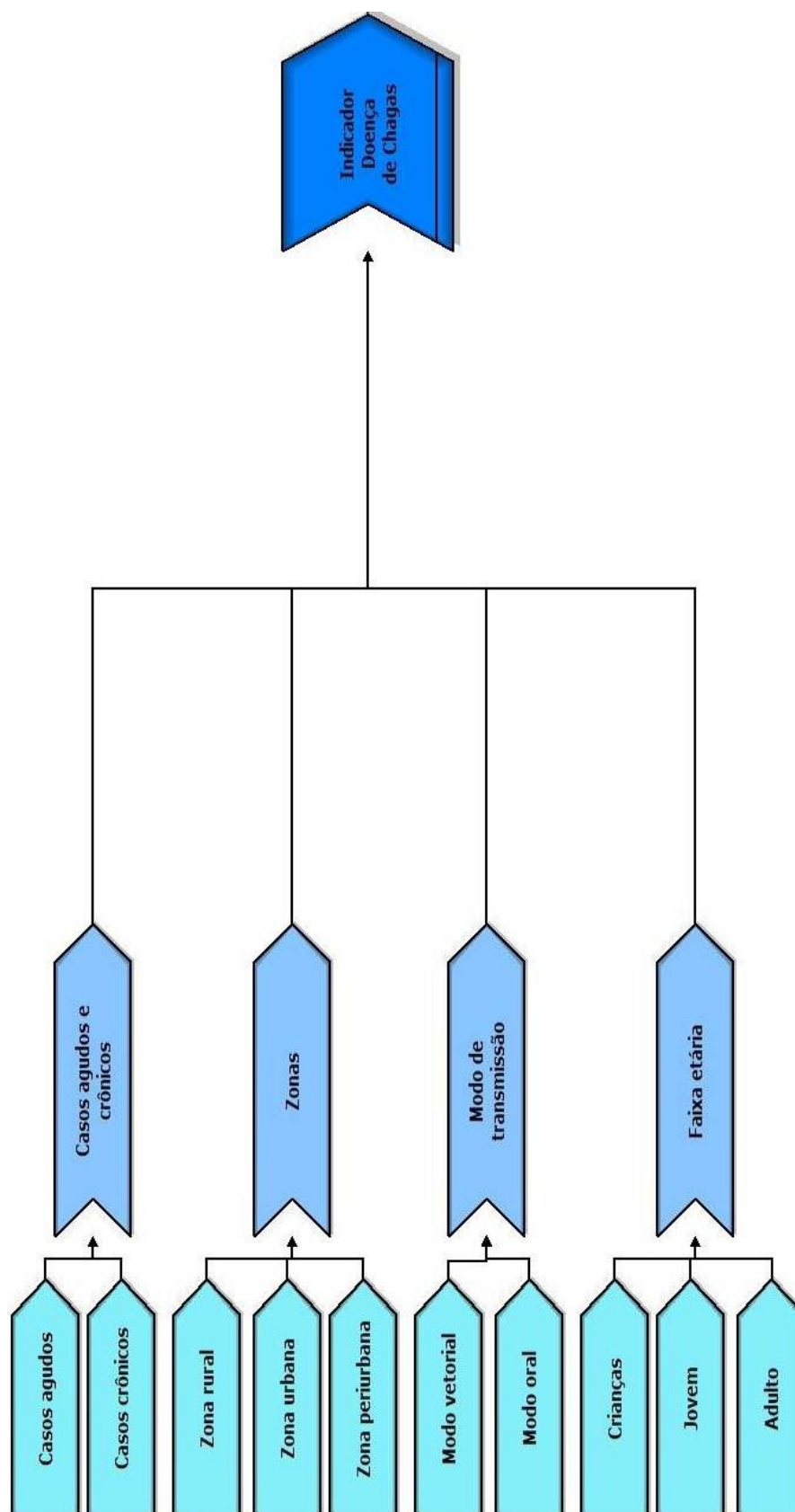


Figura 20. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador doença de Chagas

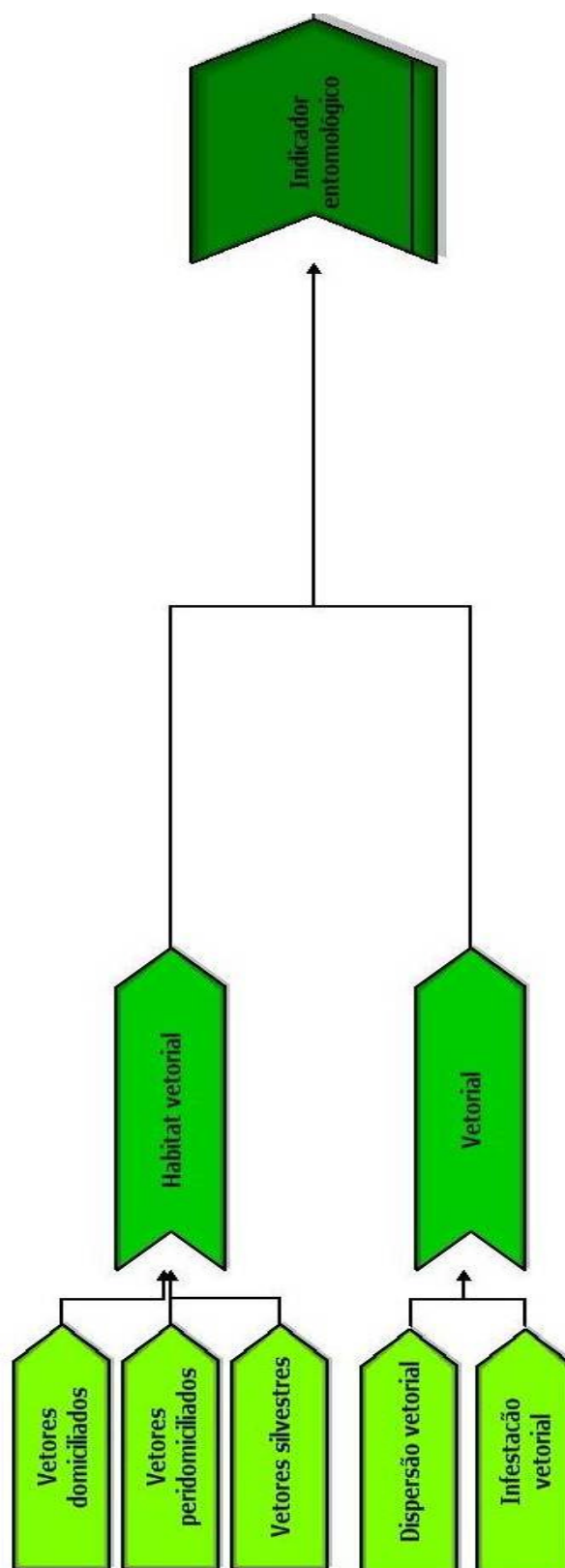


Figura 21. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador entomológico

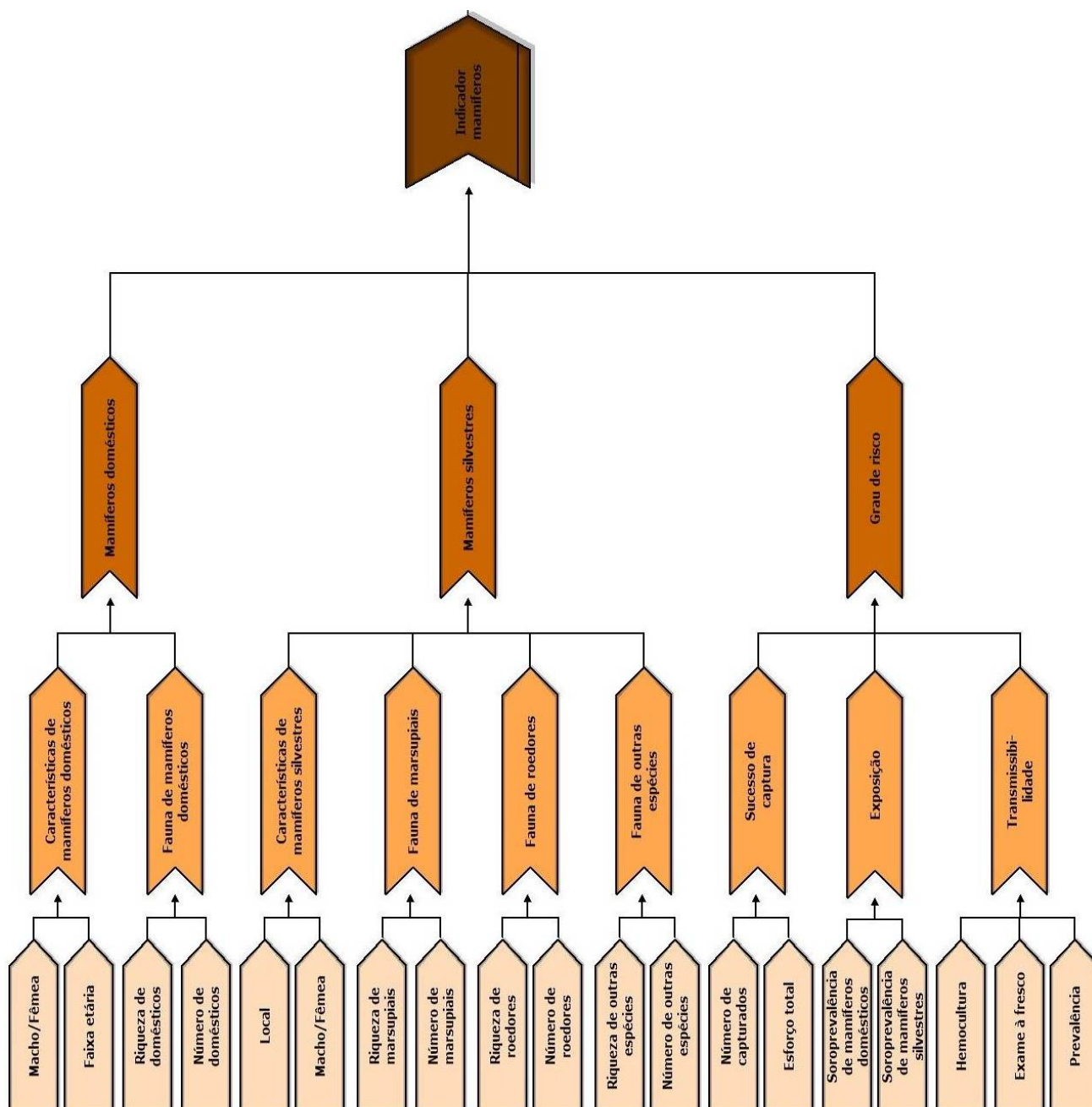


Figura 22. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador mamíferos

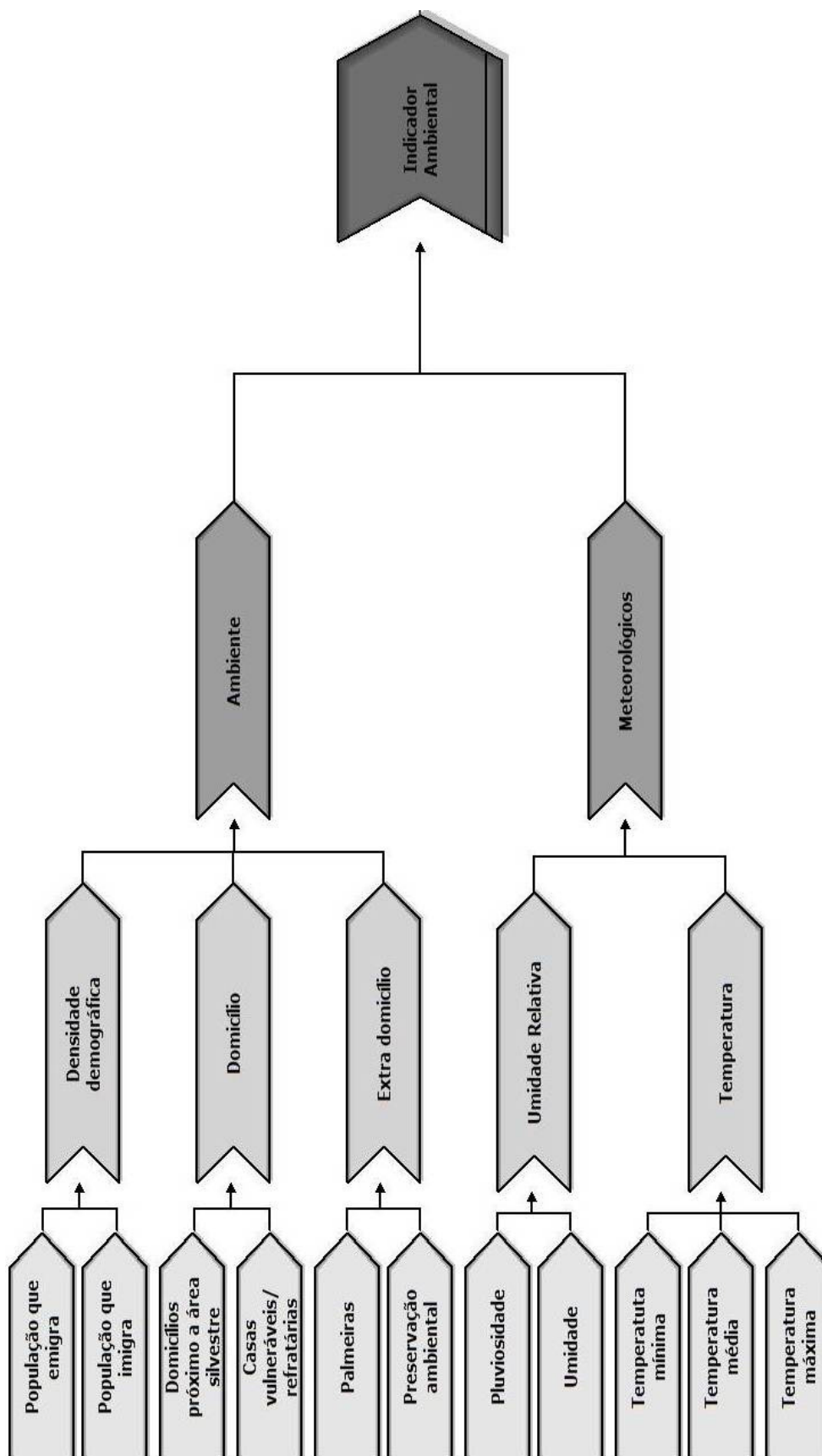


Figura 23. Fluxograma da estrutura hierárquica fuzzy: indicador ambiental

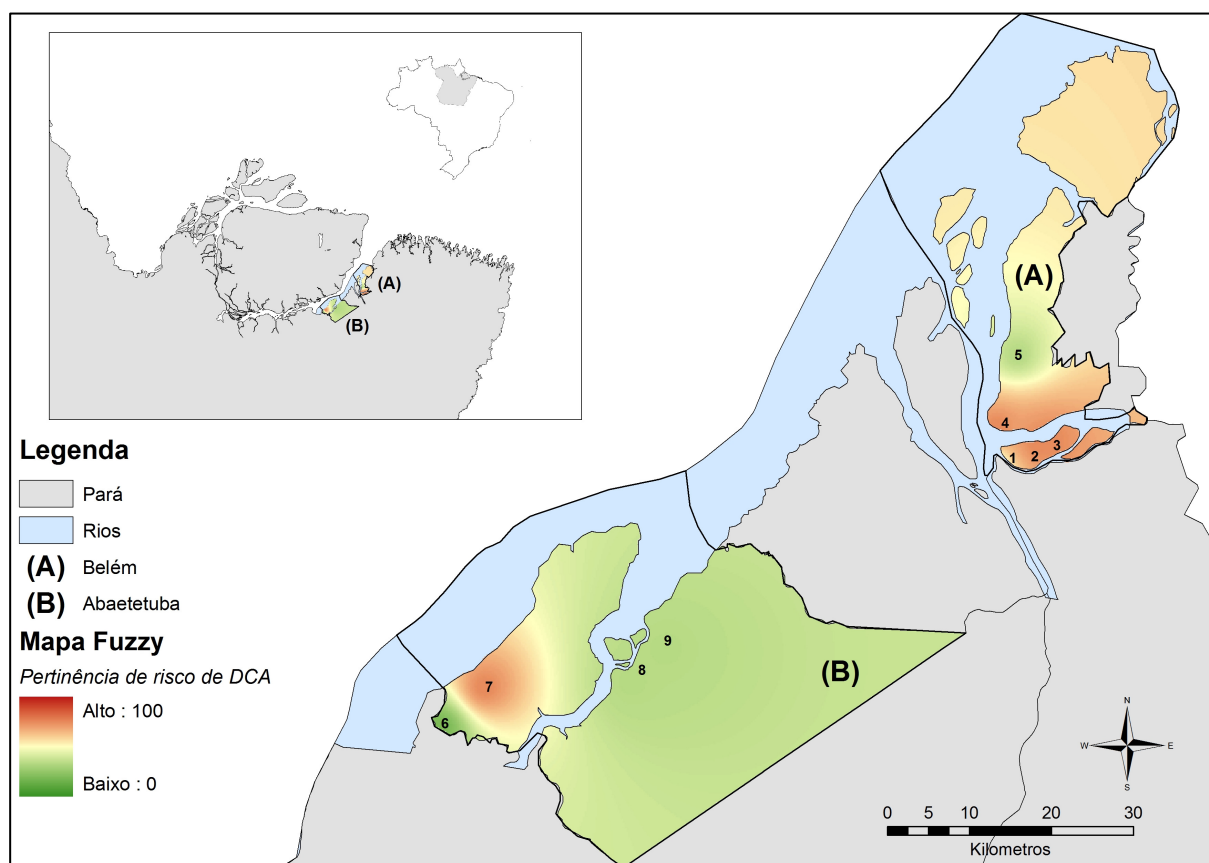


Figura 24. Mapeamento da Inferência espacial Fuzzy do risco de transmissão do *Trypanosoma cruzi*: áreas com pertinência de risco de transmissão de *T. cruzi* obtidas segundo inferência fuzzy. (A) município de Belém - Pará: (1) - Ilha do papagaio; (2) - ilha do Cumbú; (3) - Ilha do Murutucum; (4) - Jurunas; (5) - Val de Cans. (B) município de Abaetetuba - Pará: (6) - Panacaueira; (7) - Ajuai; (8) - Genipaúba; (9) - área urbana.

Tabela 2. Variáveis da árvore hierárquica de decisão fuzzy para o mapa de risco de transmissão de DCA.

Variáveis da Árvore Hierárquica de Decisão Fuzzy para o mapa de risco				
VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 1				
casos agudos	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.489 d=9.85
			Médio	a=5.49 b=9.59 c=15.1 d=19.78
			Alto	a=15.15 b=20 c=50 d=50
casos crônicos	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=10.78 d=12.6
			Médio	a=9.99 b=13.16 c=20 d=24.9
			Alto	a=20.17 b=25.1 c=50 d=50
casos agudos e crônicos	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=14.99 d=20.2
			Médio	a=14.99 b=21.4 c=40.6 d=50.2
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 2				
Zona rural	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.754 d=9.46
			Médio	a=5.093 b=10.3 c=15.3 d=20.2
			Alto	a=14.88 b=20 c=50 d=50
Zona urbana	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.489 d=9.46
			Médio	a=5.225 b=10.3 c=15.1 d=19.9
			Alto	a=14.75 b=20.3 c=50 d=50
Zona periurbana	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1.12 b=0 c=5.489 d=9.99
			Médio	a=5.225 b=10.1 c=15.3 d=20
			Alto	a=15.01 b=20 c=50 d=50
Zonas	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15.28 d=19.6
			Médio	a=14.99 b=20.2 c=40.9 d=49.9
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 3				
Modo vetorial	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.754 d=9.59
			Médio	a=5.09 b=10.1 c=16.47 d=20.2
			Alto	a=16.3 b=21 c=50.1 d=50.1
Modo oral	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.09 d=9.854
			Médio	a=3.24 b=10.1 c=18.32 d=23.1
			Alto	a=17.4 b=23.1 c=50.1 d=50.1
Modo de Transmissão	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10 d=14.99
			Médio	a=10 b=15 c=40 d=50
			Alto	a=39.72 b=50.2 c=100 d=110
Inferência 4				
Crianças	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=4.96 d=7.077
			Médio	a=3 b=8.399 c=15 d=19.9
			Alto	a=14.88 b=20.2 c=50 d=50
Jovem	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.093 d=8
			Médio	a=5.093 b=8.13 c=15 d=20.3
			Alto	a=15.01 b=20.2 c=50 d=50
Adulto	Entrada	[-1, 50]	Baixo	a=-1 b=0 c=5.093 d=8
			Médio	a=5.093 b=8.13 c=15 d=19.8
			Alto	a=15.01 b=20.2 c=50 d=50
Faixa etária	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=14.99 d=19.6
			Médio	a=14.99 b=20.2 c=40.3 d=49.9
			Alto	a=40.3 b=51.07 c=100 d=110

VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGUÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 5				
casos agudos e crônicos	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.7 d=20.2 a=14.99 b=20.5 c=40.6 d=50.5 a=40.1 b=51.1 c=100 d=110
Zonas	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.99 d=20.5 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=51 c=100 d=110
Modo de Transmissão	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20.5 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=51 c=100 d=110
Faixa etária	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20.5 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=51 c=100 d=110
Indicador Doença de Chagas	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20.2 a=14.99 b=20.5 c=40.6 d=50.8 a=40 b=50 c=100 d=110
Inferência 6				
Vetores domiciliados	Entrada	[-1, 1]	Ocasionalmente Frequentemente Habitualmente	a=-1 b=0 c=0.1495 d=0.197 a=0.1521 b=0.202 c=0.406 d=0.499 a=0.4061 b=0.501 c=1 d=1
Vetores peridomiciliados	Entrada	[-1, 1]	Ocasionalmente Frequentemente Habitualmente	a=-1 b=0 c=0.1521 d=0.202 a=0.1521 b=0.208 c=0.401 d=0.501 a=0.4008 b=0.501 c=1 d=1
Vetores silvestres	Entrada	[-1, 1]	Ocasionalmente Frequentemente Habitualmente	a=-1 b=0 c=0.1521 d=0.2 a=0.152 b=0.189 c=0.4034 d=0.504 a=0.4008 b=0.501 c=1 d=1
Habitat vetorial	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.99 d=19.9 a=15.28 b=20.2 c=40.3 d=50.2 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 7				
Dispersão vetorial	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20.52 a=14.99 b=20.8 c=40.9 d=49.9 a=40.9 b=51.1 c=100 d=110
Infestação vetorial	Entrada	[-1, 400]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=56.61 d=100 a=54.5 b=100 c=181.5 d=225 a=189 b=217.5 c=380 d=400
Vetorial	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.99 d=19.9 a=14.99 b=20.2 c=40.3 d=50.5 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110

VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 8				
Habitat vetorial	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.99 d=19.6 a=14 b=20.22 c=40.3 d=49.9 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Vetorial	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.7 d=19.9 a=14 b=20.52 c=40.3 d=50.5 a=40.6 b=51.1 c=100 d=110
Indicador Entomológico	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.99 d=19.4 a=14 b=20.22 c=40 d=50.8 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 9				
Macho/Fêmea	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=10 d=15 a=10 b=15 c=45 d=51 a=45 b=51 c=110 d=110
faixa etária	Entrada	[-1, 20]	Filhote Jovem Adulto Idoso	a=-1 b=0 c=0.6 d=1 a=0.6 b=1 c=1.5 d=2 a=1.5 b=2 c=12 d=12 a=8.5 b=9.05 c=15.1 d=20
Características de mamíferos domésticos	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=10 d=15 a=10 b=15 c=40 d=51 a=40 b=51 c=100 d=110
Inferência 10				
Riqueza de domésticos	Entrada	[-1, 10]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=1 d=2 a=1 b=2 c=4 d=5 a=4 b=5 c=10 d=10
Número de domésticos	Entrada	[-1, 200]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=20.37 d=31 a=20 b=30.95 c=53.2 d=69.6 a=53.7 b=70 c=197 d=200
Fauna de mamíferos domésticos	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=12.7 d=20.22 a=11.49 b=21.4 c=40 d=49.6 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 11				
Características de mamíferos domésticos	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=10.91 d=19.4 a=9.75 b=20 c=40.3 d=49.6 a=40.3 b=51.4 c=100 d=110
Fauna de mamíferos domésticos	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=12.4 d=18.8 a=10 b=20 c=42.34 d=50.2 a=40.6 b=51.1 c=100 d=110
Mamíferos domésticos	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=10 d=19.93 a=10.6 b=20 c=40.89 d=50.2 a=40.89 b=51.1 c=100 d=110

VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 12				
Local	Entrada	[-1, 500]	Sinantrópico Silvestre	a=-1 b=0 c=52.25 d=95.9 a=41.67 b=98.5 c=500 d=500
Macho/Fêmea	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=10 d=15.86 a=10 b=14.99 c=36.5 d=49.91 a=34.19 b=51.1 c=110 d=110
Características de mamíferos silvestres	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=10 d=20.52 a=9.17 b=19.4 c=42.34 d=49.3 a=40.01 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 13				
Riqueza de marsupiais	Entrada	[-1, 20]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=2 d=3 a=2 b=3 c=4.63 d=5.847 a=4.63 b=6 c=20 d=20
Número de marsupiais	Entrada	[-1, 50]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=6.019 d=10 a=6.415 b=9.82 c=15 d=17.9 a=15.2 b=17.53 c=50 d=50
Fauna de marsupiais	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20.52 a=15 b=20.5 c=40.9 d=50.2 a=40.89 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 14				
Riqueza de roedores	Entrada	[-1, 10]	Baixo Médio Alto	a=0 d=0 c=1.918 d=2.95 a=1.997 b=2.74 c=4.14 d=4.96 a=4.061 b=5.01 c=10 d=10
Número de roedores	Entrada	[-1, 30]	Baixo Médio Alto	a=-0.3 b=0 c=5.04 d=6.94 a=5.28 b=7.1 c=12.1 d=15 a=12.58 b=14 c=30 d=30
Fauna de roedores	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=0 b=0 c=14.99 d=19.9 a=14.99 b=20.2 c=40.9 d=49.3 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 15				
Riqueza de outras espécies	Entrada	[-1, 10]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=1 d=2 a=1 b=1.997 c=3 d=4 a=3 b=4 c=10 d=10
Número de outras espécies	Entrada	[-1, 20]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=2 d=3 a=2 b=2.4 c=4 d=4.8 a=4 b=5.106 c=20 d=20
Fauna de outras espécies	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15.28 d=20.2 a=14.99 b=20.8 c=40.6 d=49.6 a=40.01 b=51.1 c=100 d=110

VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 16				
Número de capturados	Entrada	[-1, 100]	Baixo	a=-1 b=0 c=8.86 d=13.1
			Médio	a=10.4 b=13.1 c=23.4 d=28.2
			Alto	a=22.6 b=28.44 c=100 d=100
Esforço total	Entrada	[-1, 2100]	Baixo	a=-1 b=0 c=500 d=600
			Médio	a=558 b=653 c=813.9 d=997
			Alto	a=914 b=952.8 c=2100 d=2100
Sucesso de captura	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=14.99 d=19.9
			Médio	a=14.99 b=20.2 c=40.3 d=49.3
			Alto	a=40.6 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 17				
Características de mamíferos silvestres	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10 d=15
			Médio	a=14 b=16 c=29 d=32
			Alto	a=28 b=33 c=100 d=110
Fauna de marsupiais	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10 d=15
			Médio	a=14 b=16 c=28 d=32
			Alto	a=28 b=33 c=100 d=110
Fauna de roedores	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10 d=15
			Médio	a=14 b=16 c=28 d=32
			Alto	a=28 b=33 c=100 d=110
Fauna de outras espécies	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10 d=15
			Médio	a=14 b=16 c=28 d=32
			Alto	a=28 b=33 c=100 d=110
Mamíferos silvestres	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10 d=15
			Médio	a=14 b=16 c=29 d=32
			Alto	a=28 b=33 c=100 d=110
Inferência 18				
Soroprevalência de mamíferos domésticos	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=20 d=22
			Médio	a=16 b=20.81 c=40.9 d=49.6
			Alto	a=40.6 b=51.1 c=100 d=110
Soroprevalência de mamíferos silvestres	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=12.66 d=19.6
			Médio	a=10.33 b=20.2 c=40.9 d=50.2
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Exposição	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=12.95 d=19.6
			Médio	a=11.8 b=20.22 c=40.3 d=50.8
			Alto	a=40.89 b=50.8 c=100 d=110
Inferência 19				
Hemocultura	Entrada	[-1, 130]	Acelerado	a=-0.312 b=0.688 c=30.44 d=40.4
			Lento	a=30.8 b=41.44 c=130 d=130
Exame à fresco	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15.3 d=20.2
			Médio	a=14.99 b=20.5 c=40 d=49.6
			Alto	a=39.43 b=50.5 c=100 d=110
Prevalência	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=16.15 d=20.2
			Médio	a=14.99 b=20.8 c=40.9 d=49.9
			Alto	a=40.01 b=50.8 c=100 d=110
Transmissibilidade	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15.28 d=20.8
			Médio	a=15.57 b=20.5 c=40.9 d=49.9
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110

VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 20				
Transmissibilidade	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=21 d=25
			Médio	a=18 b=22 c=40.3 d=50.8
			Alto	a=40.3 d=51.1 c=100 d=110
Exposição	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=21 d=25
			Médio	a=18 b=20.8 c=40.9 d=49.6
			Alto	a=40.89 b=50.5 c=100 d=110
Sucesso de captura	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15 d=20.52
			Médio	a=14.99 b=20.5 c=40 d=49.6
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Grau de risco	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=23 d=25
			Médio	a=18 b=24 c=40.6 d=50.2
			Alto	a=40.89 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 21				
Mamíferos domésticos	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15 d=19.6
			Médio	a=15.28 b=20.5 c=40.3 d=49.6
			Alto	a=40.3 b=51.4 c=100 d=110
Mamíferos silvestres	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15.28 d=19.6
			Médio	a=15.57 b=20.8 c=40.9 d=50.2
			Alto	a=39.72 b=50.5 c=100 d=110
Grau de risco	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=23 d=25
			Médio	a=18 b=25 c=40.6 d=50.5
			Alto	a=40.01 b=52.2 c=100 d=110
Indicador mamíferos	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=23 d=25
			Médio	a=18 b=24 c=40 d=49.3
			Alto	a=40.01 b=50.5 c=100 d=110
Inferência 22				
População que emigra	Entrada	[-1, 110]	Pequena	a=-1 b=0 c=15 d=20
			Média	a=15 b=20 c=40 d=46.42
			Grande	a=40 b=50 c=100 d=110
População que imigra	Entrada	[-1, 110]	Pequena	a=-1 b=0 c=15 d=20
			Média	a=15 b=20 c=40 d=46.42
			Grande	a=40 b=50 c=100 d=110
Densidade demográfica	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15 d=20
			Médio	a=15 b=20 c=40 d=46.42
			Alto	a=40 b=50 c=100 d=110
Inferência 23				
Domicílios próximo a área silvestre	Entrada	[-1, 500]	Perto	a=-1 b=0 c=56.2 d=89.29
			Média	a=54.9 b=86.64 c=162 d=199
			Longe	a=154 b=204.4 c=500 d=500
Casas vulneráveis/refratárias	Entrada	[-1, 110]	Baixa	a=-1 b=0 c=10 d=20.52
			Média	a=12.66 b=17 c=40 d=50.2
			Alta	a=40.89 b=51.1 c=100 d=110
Domicílio	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=10.33 d=19.4
			Médio	a=10 b=17.61 c=40.9 d=50.2
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=110 d=110

VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 24				
Palmeiras	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=13.82 d=19.6
			Médio	a=12.9 b=20.81 c=40.3 d=50.2
			Alto	a=40.3 b=50.8 c=100 d=110
Preservação ambiental	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=14.99 d=20.2
			Médio	a=14.1 b=20.81 c=40.9 d=49.9
			Alto	a=40.89 b=50.8 c=98.8 d=109
Extra domicílio	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=12.08 d=19.6
			Médio	a=11.2 b=20.52 c=40.3 d=50.2
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 25				
Domicílio	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15 d=20.52
			Médio	a=14.99 b=20.8 c=40.6 d=49.6
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=98.8 d=109
Extra domicílio	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=14.99 d=20.2
			Médio	a=15.28 b=20.5 c=40.3 d=49.3
			Alto	a=40.01 b=50.5 c=100 d=110
Densidade demográfica	Entrada	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=14.99 d=20.2
			Médio	a=14.99 b=20.2 c=40 d=49.9
			Alto	a=40.3 b=50.5 c=100 d=110
Ambiente	Saída	[-1, 110]	Baixo	a=-1 b=0 c=15.28 d=19.6
			Médio	a=15 b=20.2 c=40.3 d=49.9
			Alto	a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 26				
Pluviosidade	Entrada	[-1, 400]	Baixa	a=-1 b=0 c=100 d=113.8
			Média	a=100 b=113 c=184 d=211.1
			Alta	a=193 b=200.5 c=400 d=400
Umidade	Entrada	[-1, 110]	Baixa	a=-1 b=0 c=30 d=40.01
			Média	a=33 b=37.7 c=56.02 d=64.2
			Alta	a=55.4 b=64.75 c=100 d=110
Umidade relativa	Saída	[-1, 110]	Baixa	a=-1 b=0 c=22.8 d=30.12
			Média	a=22.84 b=32.2 c=47.9 d=54.9
			Alta	a=45.5 b=56.6 c=100 d=110
Inferência 27				
Temperatura mínima	Entrada	[-1, 30]	Baixa	a=-1.2 b=0 c=18.6 d=21.15
			Média	a=19.2 b=20.5 c=25.1 d=26.79
			Alta	a=25.3 b=26.47 c=30 d=30
Temperatura média	Entrada	[-1, 31]	Baixa	a=-1 b=0 c=20.3 d=23
			Média	a=20.3 b=22.1 c=25.2 d=26.7
			Alta	a=25.7 b=26.28 c=31 d=31
Temperatura máxima	Entrada	[-1, 36]	Baixa	a=-1 b=0 c=25 d=27
			Média	a=25.3 b=26.71 c=29.2 d=31
			Alta	a=29.86 b=30.3 c=36 d=36
Temperatura	Saída	[-1, 110]	Baixa	a=-1 b=0 c=15 d=25
			Média	a=20 b=25 c=35 d=45
			Alta	a=35 b=45 c=100 d=110

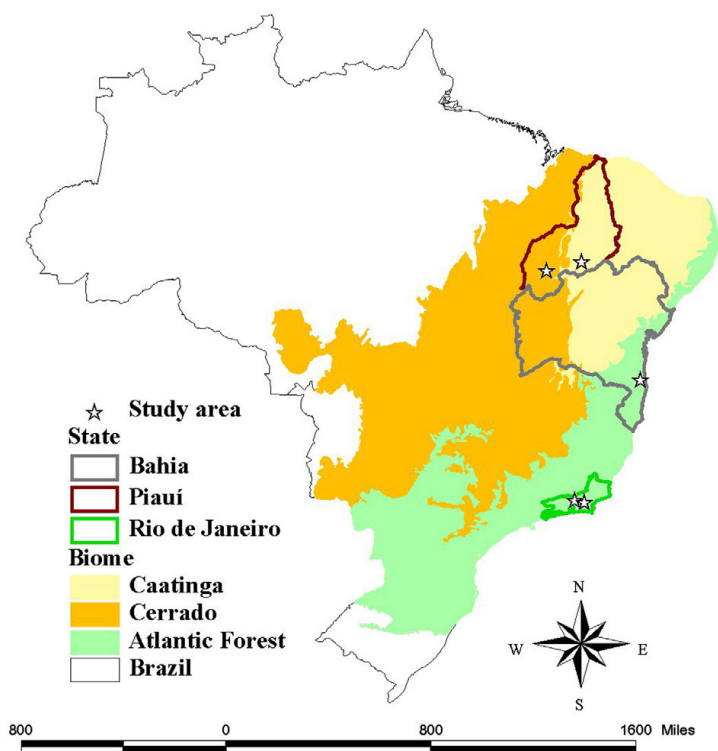
VARIÁVEL	TIPO	DOMÍNIO	TERMOS LINGÜÍSTICOS	PARÂMETROS
Inferência 28				
Umidade Relativa	Entrada	[-1, 110]	Baixa Média Alta	a=-1 b=0 c=16 d=25.46 a=15.3 b=25.5 c=45 d=55.15 a=45.25 b=55.4 c=100 d=110
Temperatura	Entrada	[-1, 110]	Baixa Média Alta	a=-1 b=0 c=15 d=20 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=50 c=100 d=110
Meteorológicos	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=14.99 d=20.2 a=14.99 b=20.5 c=40.6 d=50.2 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 29				
Ambiente	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=13.82 d=19.6 a=13 b=20.22 c=42.3 d=49.9 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Meteorológicos	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=12.66 d=19.6 a=10.91 b=20.5 c=40.6 d=49.6 a=40.3 b=51.1 c=100 d=110
Indicador Ambiental	Saída	[-1, 110]	Desfavorável Favorável Muito Favorável	a=-1 b=0 c=15 d=20.81 a=14.99 b=20.8 c=40.9 d=49.9 a=40.89 b=51.1 c=100 d=110
Inferência 30				
Indicador Doença de Chagas	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=50 c=100 d=110
Indicador Entomológico	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=50 c=100 d=110
Indicador Mamíferos	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=22 d=25 a=18 b=25 c=40 d=50 a=40 b=50 c=100 d=110
Indicador Ambiental	Entrada	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=15 d=20 a=15 b=20 c=40 d=50 a=40 b=50 c=100 d=110
Mapa Fuzzy de risco de transmissão do <i>T. cruzi</i>	Saída	[-1, 110]	Baixo Médio Alto	a=-1 b=0 c=22 d=25 a=18 b=25 c=40 d=50 a=40 b=50 c=100 d=110

Anexo 2.

Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes

Araújo, C.A.C., Waniek, P.J., **XAVIER, S.C.C.**, Jansen, A.M.

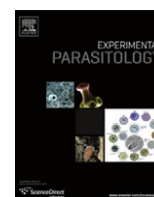
Experimental Parasitology, 127 (2011): 308-312. doi:10.1016/j.exppara.2010.07.013





Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

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

Research Brief

Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes

C.A.C. Araújo*, P.J. Waniek, S.C.C. Xavier, A.M. Jansen

Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2010

Received in revised form 11 July 2010

Accepted 20 July 2010

Available online 23 July 2010

Keywords:

Trypanosoma cruzi

Triatomines

Mammals

Tcl–TcIIa-e (Tcl–TcVI) DTUs

Chagas disease

ABSTRACT

Chagas disease is an enzootic disease, in which the flagellate *Trypanosoma cruzi* infects a large variety of animals. Humans are accidentally infected due to the migration into wild environments. To identify *T. cruzi* discrete typing units (DTUs), 19 Brazilian isolates from different biomes and hosts were analyzed by PCR amplification of 24S α rRNA, 18S rRNA and mini-exon gene sequences. The majority of the isolates was classified as TcIIb (TcII) but subtypes TcIIc (TcIII) and TcII d (TcV) were also identified. In addition, in monkeys TcI was detected.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), the causative agent of Chagas disease is widely distributed in Latin America and considered as an eclectic parasite that circulates in sylvatic, peridomestic and domestic environments (Garcia et al., 2007). The transmission of *T. cruzi* in the wild is highly complex, but groups into sylvatic and domestic transmission cycles in which humans, wild/domestic animals and vectors are implicated (Fernandes et al., 1998, 1999; Araújo et al., 2009).

The heterogeneity of *T. cruzi* was identified by biochemical methods including electrophoretic profiles (zymodeme studies) (Miles et al., 1977). The intra-lineage genetic diversity within TcII group (TcIIa-e) was demonstrated by analysis of small rRNA subunits, the mini-exon gene and microsatellites (Miles et al., 1977; Fernandes et al., 1999; Brisse et al., 2001; Llewellyn et al., 2009a,b). With the objective to elucidate the distribution of *T. cruzi* in the nature considering molecular epidemiology features, discrete typing units (DTUs: TcI–TcIIa-e) were established as a new marker (Brisse et al., 2000). For better understanding of the intra-specific organization of this taxon, recently the six classic *T. cruzi* DTUs were replaced by novel nomenclature (TcI–TcVI) (Zingales et al., 2009).

Because *T. cruzi* is extremely heterogeneous and widely distributed in Brazil, understanding its transmission cycles for improved disease control will require analysis of the structural composition of its subpopulations. *T. cruzi* TcII, a genotype of high genetic diversity, has been particularly associated with human disease in Brazil

(Fernandes et al., 1998, 1999), but the range of TcII populations and subtypes remains unknown. We therefore aimed to use PCR amplification of 24S α rRNA, 18S rRNA and mini-exon genes to characterize discrete typing units (DTUs) of TcI and TcIIa-e (TcI–TcVI) from *T. cruzi* isolates obtained from different hosts and biomes.

2. Material and methods

2.1. Origin of *T. cruzi* isolates

Isolates from different regions and hosts (Fig. 1, Table 1) were characterized. One isolate originated from a human case in a semi-arid region of Brazil (Piauí, 1999), two and three isolates from rodents and triatomines, respectively, were collected in different localities of Piauí (from 1999–2006). Eleven isolates were collected from three species of primates in Rio de Janeiro and Bahia (Atlantic Rain Forest, from 1999–2003), and one isolate was obtained from a marsupial (Rio de Janeiro, 1999).

2.2. Maintenance of the parasites

The parasites were grown in McNeal, Novy and Nicolle (NNN) medium with a liver infusion tryptose (LIT) overlay supplemented with 10% fetal calf serum (Chiari and Camargo, 1984; Araújo et al., 2007, 2008). All isolates had low number of (four) passages in culture medium and were stored in liquid nitrogen until use.

2.3. Genomic DNA extraction and characterization of *T. cruzi* isolates

T. cruzi cultures were washed twice in PBS (pH 7.2) with centrifugation at 2800g; genomic DNA was extracted using the

* Corresponding author.

E-mail address: caaraujo@hotmail.com (C.A.C. Araújo).

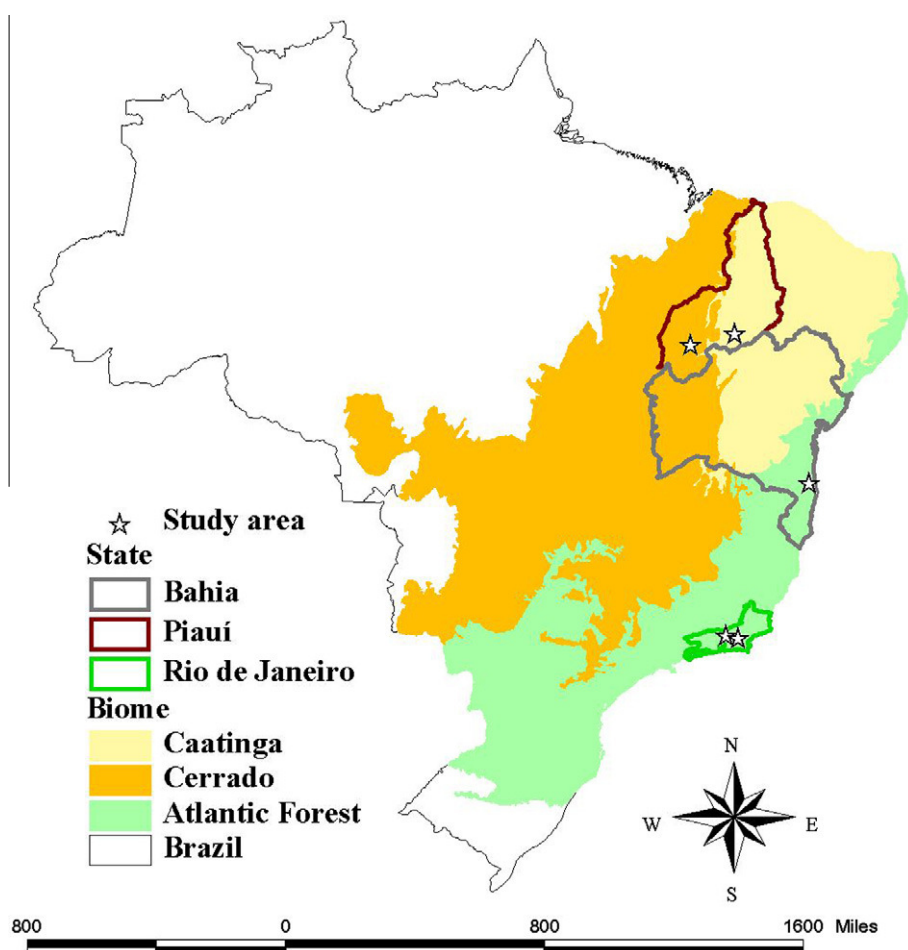


Fig. 1. Study areas and the respective Brazilian biomes.

Table 1

Trypanosoma cruzi isolates from Brazil characterized by 24S α rRNA, 18S rRNA and mini-exon gene size.

Isolates	Locality	Host	Genotype	Biome
Y	São Paulo, SP	Human	TcIIb	–
316	João Costa, PI	Human	TcIIb	Caatinga
JCA4	João Costa, PI	<i>Triatoma brasiliensis</i>	TcIIb	Caatinga
JCA3	João Costa, PI	<i>Triatoma brasiliensis</i>	TcIIb	Caatinga
JCA6	João Costa, PI	<i>Triatoma brasiliensis</i>	TcIIb	Caatinga
594	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
291	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcI	Atlantic Rain Forest
593	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
543	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
657	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcI	Atlantic Rain Forest
832	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
684	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
659	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
524	Rio de Janeiro, RJ	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TcI	Atlantic Rain Forest
P24	Rio de Janeiro, RJ	<i>Cebus apella apella</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
X24	Ilhéus, BA	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	TcIIb	Atlantic Rain Forest
650	Teresópolis, RJ	<i>Didelphis marsupialis</i>	TcI/TcIIb	Atlantic Rain Forest
10148	Jurubeba, PI	<i>Thrichomys a. laurentius</i>	TcIIc	Cerrado
4251	Pedra Solta, PI	<i>Thrichomys a. laurentius</i>	TcIIc	Caatinga

SV Genomic DNA Purification System kit (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's protocol. PCR amplification of the divergent domains of 24S α rRNA, 18S rRNA and the mini-exon gene was carried out in a Mastercycler® (Eppendorf, Germany) as described previously (Brisse et al., 2001). PCR products were separated by electrophoresis on 3% agarose gels and stained with ethidium bromide.

3. Results

3.1. *T. cruzi* characterization

After amplification of 24S α rRNA, 18S rRNA and mini-exon gene and characterization of band sizes, most *T. cruzi* isolates from human, triatomines and primates could be classified as TcIIb (TcII),

three isolates from *Leontopithecus rosalia* were classified as TcI and two isolates obtained from *Thrichomys apereoides laurentius* (previously described as *T. apereoides*) as TcIIc (TcIII) and TcII d (TcV), respectively (Fig. 2, Table 1). *Didelphis marsupialis* was co-infected with two *T. cruzi* genotypes, TcI and TcIIb (TcII). A weaker PCR product of 250 bp in the mini-exon analysis (Fig. 2A, lane 20) was observed from the isolate characterized as TcIIc (TcIII) in accordance with the observations of Yeo and coworkers (Yeo et al., 2005). The PCR products shown in Fig. 2 have band sizes corresponding to those reported by Brisse and coworkers (2001), with exception of the TcII d (TcV) isolate that generated a band of ~175 bp in the 18S rRNA region (Fig. 2B, lane 15). Considering the mixed isolate (Fig. 2, lane 16), the 24S α rRNA and 18S rRNA amplification products of TcI were slightly larger (~180 and ~115 bp, respectively), whereas the 24S α rRNA amplificate of TcIIb (TcII) was slightly smaller (~120 bp).

4. Discussion

T. cruzi lineages are well distributed throughout different regions, dissimilar biomes in Latin America. Its genetic diversity demonstrated by ecology and phylogeny parameters had suggested an evolutionary relationship of the subpopulations of *T. cruzi* with vectors, mammalian hosts and the sylvatic/domestic environments (Miles et al., 1981; Yeo et al., 2005). In addition, natural subpopulations of *T. cruzi* seem to be very heterogeneous con-

sidering also their biological aspects (Coura, 2007). Miles and collaborators used biochemical methods to demonstrate intraspecific heterogeneity of *T. cruzi* and the complexity of its transmission cycles (Miles et al., 1977). However, little is known whether or not parasite subtypes differ according to the host.

Didelphis sp. is a facultative arboreal and synanthropic mammal that has been reported to be a natural host of TcI (Schofield, 2000; Yeo et al., 2005; Marcili et al., 2009a; Miles et al., 2009). This marsupial species is also well distributed in rainforest areas, mainly in the north and south of the Amazon Basin (Yeo et al., 2005). Nevertheless, our data revealed the presence of TcIIb (TcII) in *D. marsupialis* (Fig. 2, Table 1), as has previously been reported in other *Didelphis* species (Marcili et al., 2009b). Because *Didelphis* spp. are similar to *Philander* spp. in their behavior and distribution in arboreal and terrestrial environments (Yeo et al., 2005), one might expect that the two hosts could harbor both TcI and TcII genotypes. In addition, 90 Myr ago the two genotypes of *T. cruzi* (TcI and TcII) had evolutionary diverged and marsupials which dispersed in the South American continent possessed both genotypes (Briones et al., 1999). The presented case, in which a marsupial species was co-infected with TcI and TcIIb (TcII) emphasizes the significance of this hypothesis.

The TcII subtype is one of the main agents of Chagas disease in the Southern Cone region of South America (Miles et al., 2009) and circulates among others in the Brazilian Atlantic Rain Forest, but with an uncertain ecological niche. So far, TcII genotype is commonly associated with caviomorph mammals and primates, both

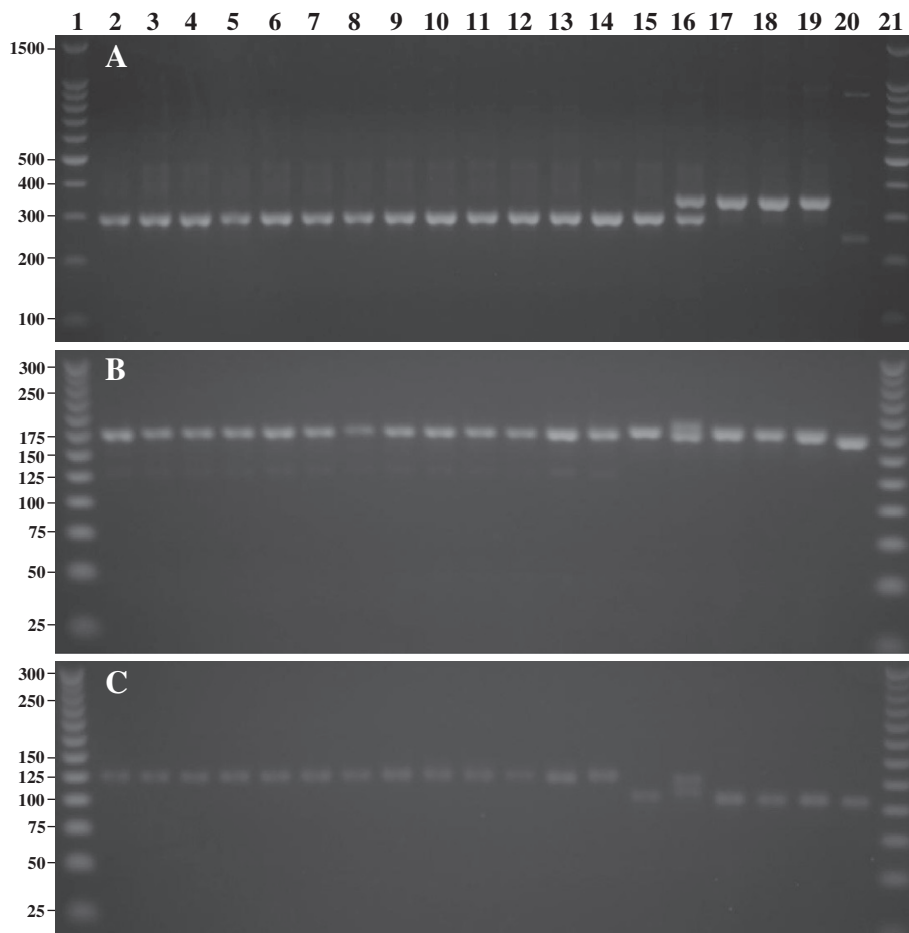


Fig. 2. PCR amplification products of Mini-exon gene (A), 18S rRNA (B) and 24S α rRNA (C), respectively, analyzed on 3% ethidium bromide stained agarose gels. Lanes: (1) and (21) 100 bp (A) and 25 bp (B, C) marker (Promega); (2) Y, (3) JCA3, (4) 594, (5) 593, (6) JCA6, (7) 684, (8) 543, (9) JCA4, (10) 659, (11) 832, (12) 316, (13) P24, (14) X24, (15) 4251, (16) 650, (17) 291, (18) 657, (19) 524, (20) 10148.

an ancient placental reservoir of *T. cruzi* (Briones et al., 1999; Yeo et al., 2005), also identified in different triatomine species, such as *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida* and mainly *Triatoma brasiliensis* (Fernandes et al., 1998; Herrera et al., 2003). The latter is frequently found naturally infected by *T. cruzi*, in semi-arid areas of the north-eastern region of Brazil (Costa et al., 2003). In the present work, the parasites isolated from *T. brasiliensis* were classified as TcIIb (TcII) (Fig. 2), though this insect species possibly also harbor TcI (Fernandes et al., 1998; Araújo et al., 2009).

Primates infected with TcI subtype have already been reported in the Amazon region (Marcili et al., 2009a). Although the tamarin *L. rosalia* is predominantly thought to harbor TcII (Briones et al., 1999), the present study detected TcI in this species (Fig. 2, Table 1). Due to the tectonic separation of Africa and South America (Stevens et al., 1999; Stevens and Rambaut, 2001), the aspect that *T. cruzi* primarily appeared in Africa cannot be excluded. The relation between *T. cruzi* and monkeys from South America is supposed to be a more recent one (Hamilton et al., 2009). Additionally, *T. cruzi*-like parasites are widely dispersed in different biomes and hosts, also identified in monkeys from South East Asia, though identified by morphology and lifecycle features (Kuntz et al., 1970; Hamilton et al., 2009).

The phylogenetic position of TcIIc (TcIII) is still unclear though the subtype has been considered to be a hybrid of TcI and TcIIb (TcII) (Westenberger et al., 2005). It is thought that TcIIc (TcIII) frequently occurs in sylvatic ecotopes and is associated with terrestrial transmission cycle that includes armadillos, terrestrial/arboreal marsupials such as *Philander frenata*, *Monodelphis* sp. and rodents (Yeo et al., 2005; Llewellyn et al., 2009a; Marcili et al., 2009a). TcIIc (TcIII) was identified in the terrestrial caviomorph rodent *T. a. laurentius* from north-eastern Brazil, Piauí State (Fig. 2; formerly described as *T. apereoides* by Herrera et al., 2005). In addition, the products size obtained from PCR amplifications using the 24S α rRNA and 18S rRNA markers (110 and 165 bp, respectively) corroborates with the results presented by Brisse et al. (2001) and Lewis et al. (2009). Thus the PCR products of the mini-exon gene and 24S α rRNA from *T. a. laurentius* had the expected sizes of 300 and 110 bp (18S rRNA region length differed), respectively, the combination was classified as TcIIId (TcV) (Brisse et al., 2001; Lewis et al., 2009). Variations within DTUs are not uncommon and *T. cruzi* isolates, from hosts not previously analyzed frequently display small differences in band sizes (Brisse et al., 2001). TcIIId (TcV), a theoretical hybrid of TcIIb (TcII) and TcIIc (TcIII), was also identified in this rodent species (Fig. 2). Although the ecological niche and hosts for TcIIId (TcV) are not conclusively known (Miles et al., 2009), TcIIId (TcV) has been identified so far in *Triatoma infestans* (Argentina, Bolivia and Paraguay) and in cases of human congenital transmission in Argentina and Bolivia (Virreira et al., 2006; Corrales et al., 2009). However, our results suggest that TcIIc (TcIII) and TcIIId (TcV) have a larger host range and distribution pattern than previously described because both genotypes were found in dissimilar biomes, the cerrado and caatinga. In addition, it is important to mention that mini-exon is a marker that clearly discriminates between TcI and TcII (TcII–VI) subtypes (Fig. 2), which also was shown by Lewis et al. (2009). A consolidated view indicates that the Mini-exon amplification products are highly homogenous, while the amplicates of the two rRNA regions show minor differences (Fig. 2).

We report the first description of *T. cruzi* TcI in the tamarin species *L. rosalia* and the occurrence of DTUs TcIIc (TcIII) and TcIIId (TcV) in the semi-arid north-eastern region of Brazil, Piauí State. To the best of our knowledge, *T. cruzi* DTUs from Piauí have not been analyzed before. Although three *T. cruzi* DTUs TcIIb, IIc and IIId (TcII, III and V) were identified, it seems likely that analysis of additional isolates from this region will reveal further variants. Previous studies reported the TcIIc (TcIII) and TcIIId (TcV) geno-

types in armadillos of the sylvatic ecotope. In the present work, both genotypes were also identified in a caviomorph rodent adapted to a rocky environment in semi-arid areas composed of cerrado and caatinga vegetations. *T. cruzi* is a genetically diverse parasite that circulates in Brazil in a wide range of mammals and insect species, but the host associations and geographic distributions of *T. cruzi* DTUs have not yet been fully characterized. The transmission cycles of the parasite remain a complex enigma in which, both domestic and sylvatic transmissions take place and can even overlap in particular locations. Further work will be required to elucidate the ecology and epidemiology of different *T. cruzi* lineages.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. V. Bongertz (Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, FIOCRUZ, Rio de Janeiro) for English corrections and Prof. J. Borges-Pereira (Laboratório de Doenças Parasitárias, FIOCRUZ, Rio de Janeiro) for providing the isolate 316H. The authors are also thankful to the unknown reviewers. Except 316H, all isolates in the present study originated from ColTryp/IOC-FIOCRUZ. This work was supported by FAPERJ (Cientistas do Nosso Estado: E-26/100.456/2007), CNPq (Edital Universal: 472276/2006-9) and EC contracts 223034 ChagasEpiNet. C.A.C.A. is a CNPq Research Fellow (PDJ: 151187/2009-6), P.J.W. is a FAPERJ Research Fellow (E-26/152.913/2005), S.C.C.X. is a Doctor Student and A.M. Jansen is a FIOCRUZ Researcher.

References

- Araújo, C.A.C., Cabello, P.H., Jansen, A.M., 2007. Growth behavior of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *in vitro* and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Tropica* 101, 225–231.
- Araújo, C.A.C., Waniek, P.J., Jansen, A.M., 2008. Development of a *Trypanosoma cruzi* (TcI) isolate in the digestive tract of an unfamiliar vector, *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Tropica* 107, 195–199.
- Araújo, C.A.C., Waniek, P.J., Jansen, A.M., 2009. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9, 227–234.
- Briones, M.R.S., Souto, R.P., Stolf, B.S., 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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 104, 219–232.
- Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30, 35–44.
- 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. *International Journal for Parasitology* 31, 1218–1226.
- Chiari, E., Camargo, E.P., 1984. Culture and cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Morel, C.M. (Ed.), *Genes and Antigens of Parasites, A Laboratory Manual*. Fundação Oswaldo Cruz, World Health Organization, Rio de Janeiro, pp. 23–26.
- Corrales, R.M., Mora, M.C., Negrette, O.S., Diosque, P., Lacunza, D., Virreira, M., Breniere, S.F., Basombrio, M.A., 2009. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IIId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 278–282.
- Costa, J., Almeida, C.E., Dotson, E.M., Lins, A., Vinhaes, M., Silveira, A.C., Beard, C.B., 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993–1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 443–449.
- Coura, J.R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1), 113–122.
- Fernandes, O., Souto, R.P., Castro, J.A., Pereira, J.B., Fernandes, N.C., Junqueira, A.C.V., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Degraeve, W., Zingales, B., Campbell, D.A., Coura, J.R., 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using the mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 807–811.
- Fernandes, O., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Morel, C.M., Zingales, B., Campbell, D.A., Jansen, A.M., 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118, 161–166.
- García, E.S., Ratcliffe, N.A., Whitten, M.M., Gonzalez, M.S., Azambuja, P., 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology* 53, 11–21.

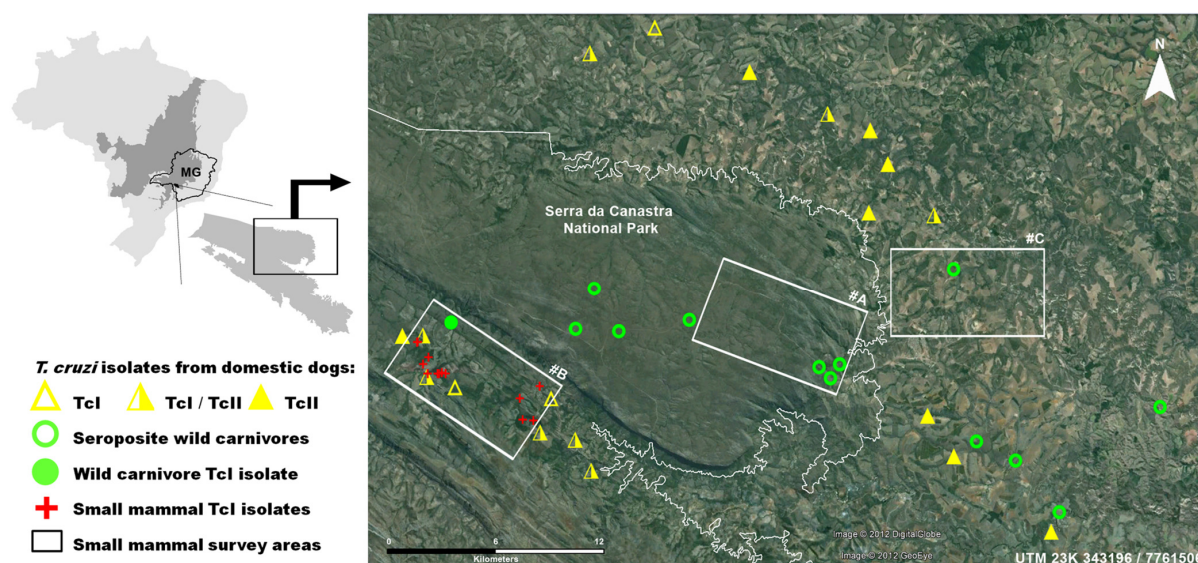
- Hamilton, P.B., Adams, E.R., Njiokou, F., Gibson, W.C., Cuny, G., Herder, S., 2009. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 81–86.
- Herrera, L., Pinho, A.P., Viegas, C., Lorosa, E., Xavier, S.C.C., Emperaire, L., Mangia, R.H., Carrasco, H., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2003. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in João Costa, Piauí. *Acta Parasitologica* 48, 294–300.
- Herrera, L., D'Andrea, P.S., Xavier, S.C.C., Mangia, R.H., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99, 379–388.
- Kuntz, R.E., Myers, B.J., McMurray, T.S., 1970. *Trypanosoma cruzi*-like parasites in the slow loris (*Nycticebus coucang*) from Malaysia. *Transactions of the American Microscopical Society* 89, 304–307.
- Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 1041–1049.
- Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H.J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M.A., Gaunt, M.W., 2009a. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e510.
- Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Carrasco, H.J., Lewis, M.D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S.A., Gaunt, M.W., 2009b. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000410.
- Marcili, A., Valente, V.C., Valente, S.A., Junqueira, A.C.V., Maia da Silva, F., Pinto, A.Y.N., Naiff, R.D., Campaner, M., Coura, J.R., Camargo, E.P., Miles, M.A., Teixeira, M.M.G., 2009a. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology* 39, 615–623.
- Marcili, A., Lima, L., Valente, V.C., Valente, S.A., Batista, J.S., Junqueira, A.C.V., Souza, A.I., Rosa, J., Campaner, M., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Teixeira, M.M.G., 2009b. Comparative phylogeographic of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 1265–1274.
- Miles, M.A., Toye, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G., 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 217–225.
- Miles, M.A., Povoas, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J., Ketteridge, D.S., 1981. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 667–674.
- Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W., Mauricio, I.L., 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136, 1509–1528.
- Schofield, C.J., 2000. *Trypanosoma cruzi* – the vector-parasite paradox. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 535–544.
- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Dover, G.A., Gibson, W.C., 1999. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118, 107–116.
- Stevens, J.R., Rambaut, A., 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution* 1, 143–150.
- Westenberger, S.J., Barnabé, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R., 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171, 527–543.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A.J., López, E., González, N., Patterson, J.S., Gaunt, M.W., Arias, A.R., Miles, M.A., 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology* 35, 225–233.
- Virreira, M., Alonso-Vega, C., Solano, M., Jijena, J., Brutus, L., Bustamante, Z., Truyens, C., Schneider, D., Torrico, F., Carlier, Y., Svoboda, M., 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 871–879.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054.

Anexo 3.

***Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil.**

Fabiana Lopes Rocha, André Luiz Rodrigues Roque, Ricardo Corassa Arrais, Jean Pierre Santos, Valdirene dos Santos Lima, **Samanta Cristina das Chagas Xavier**, Pedro Cordeir-Estrela, Paulo Sérgio D'andrea and Ana Maria Jansen (2012).

Parasitology (2012) doi:10.1017/S0031182012001539



Trypanosoma cruzi TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil

FABIANA LOPES ROCHA^{1,2,3}, ANDRÉ LUIZ RODRIGUES ROQUE¹, RICARDO CORASSA ARRAIS⁴, JEAN PIERRE SANTOS⁵, VALDIRENE DOS SANTOS LMA¹, SAMANTA CRISTINA DAS CHAGAS XAVIER¹, PEDRO CORDEIR-ESTRELA², PAULO SÉRGIO D'ANDREA² and ANA MARIA JANSEN^{1*}

¹ Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. Pav. Rocha Lima 516. Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21045-900, Brazil

² Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21045-900, Brazil

³ Triade – Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação – Rua Silveira Lobo, 32, Caixa Postal 48, Bairro Casa Forte. Recife-PE. CEP: 52061-030, Brazil

⁴ Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal. Universidade de São Paulo, USP. Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87. Cidade Universitária. São Paulo – SP. CEP: 05508-270, Brazil

⁵ Instituto Pró-carnívoros. Av. Horácio Neto, 1030 – Parque Edmundo Zanon. Atibaia-SP – CEP: 12945-010, Brazil

(Received 6 June 2012; revised 11 July and 31 July 2012; accepted 19 August 2012; first published online 12 October 2012)

SUMMARY

Aiming to better understand the ecological aspects of *Trypanosoma cruzi* transmission cycles, wild carnivores, small mammals and dogs were examined for *T. cruzi* infection in the Serra da Canastra National Park region, Brazil. Isolates were genotyped using mini-exon gene and PCR-RFLP (1f8 and H3) genomic targets. *Trypanosoma cruzi* transmission was well established in the area and occurred in both wild and peridomestic environments. Dog seroprevalence was 29.4% (63/214) and TcI and TcII genotypes, besides mixed infections were observed. Only TcI was detected in wild mammals. Marsupials displayed lower relative abundance, but a high prevalence of positive haemocultures (4/22), whereas rodents displayed positive haemocultures (9/113) mainly in the abundant *Akodon montensis* and *Cerradomys subflavus* species. The felid *Leopardus pardalis* was the only carnivore to display positive haemoculture and was captured in the same region where the small mammal prevalence of *T. cruzi* infection was high. Two canid species, *Chrysocyon brachyurus* and *Cerdocyon thous*, were serologically positive for *T. cruzi* infection (4/8 and 8/39, respectively), probably related to their capacity to exploit different ecological niches. Herein, dog infection not only signals *T. cruzi* transmission but also the genotypes present. Distinct transmission strategies of the *T. cruzi* genotypes are discussed.

Key words: transmission cycles, trophic network, reservoir, Discrete Typing Units, Chagas disease, Serra da Canastra National Park, Brazil.

INTRODUCTION

The aetiological agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, is a multi-host parasite found in more than 100 mammalian species and capable of infecting almost all cell types (Noireau *et al.* 2009). Human infections have been generally associated with contact with the contaminated feces of infected triatomine bugs, besides blood transfusion, organ transplantations, congenital transmission and oral transmission. Indeed, this latter has been responsible for the most recent outbreaks in Brazil and is probably the most ancient route of infection among wild animals (Noireau *et al.* 2009,

Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). The continually new human cases demonstrate that numerous aspects of Chagas disease epidemiology still remain unclear, probably because the transmission cycles of the parasite are maintained in intricate transmission networks that embrace several mammalian and vector species, resulting in unique epidemiological scenarios.

Trypanosoma cruzi is a highly diverse complex of genetic lineages. The current nomenclatural consensus recognizes 6 major genotypes or 'Discrete Typing Units' (DTUs) within the taxon, *T. cruzi* I (TcI) to *T. cruzi* VI (TcVI) (Zingales *et al.* 2009). To date, all of them occur in Brazil, although with different geographical distribution patterns and ecological characteristics. TcI is described to be an ubiquitous lineage in view of the diversity of its hosts, vectors and habitats. The TcII lineage is reported to have a more restricted geographical distribution and to

* Corresponding author: Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. Pav. Rocha Lima 516. Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21045-900, Brazil. Fax: +55 21 2560 6572. E-mail: jansen@ioc.fiocruz.br

occur in focal transmission cycles. However, it has been described in several mammalian taxa and biomes (Lisboa *et al.* 2006, 2008; Herrera *et al.* 2008), suggesting that it may be much more widespread than is currently acknowledged. TcIII is found mainly in the Amazonia biome, although sparsely reported throughout the country. TcIV has been recorded in northern and northeastern Brazil, whereas TcVI has been found in the middlewestern and southern regions (Zingales *et al.* 2012). TcV is described to occur in Argentina, Bolivia, Paraguay and in northeastern Brazil (Araujo *et al.* 2011). This broad distribution in distinct mammalian host species suggests that we are far from understanding the dispersion strategies of each lineage and its consequence for the epidemiology of *T. cruzi* infection.

The importance of each mammalian species in the maintenance and dispersion of a multi-host parasite like *T. cruzi* will rely mainly on the ability of the parasite to persist in the mammalian host and be transmitted to the vector, besides the host's relative abundance. In this sense, we consider as reservoir a species or community responsible for the long term survival of a parasite in a given area (Ashford, 1996), in which the role of each host species should be interpreted at intervals of time and space as well as accounting for the community composition and environmental characteristics. Thus, the importance of domestic dogs as reservoirs of *T. cruzi* varies throughout Latin America. In northwestern Argentina, dogs displaying high parasitaemias and infectiousness to vectors for long periods have been recorded (Gurtler *et al.* 2007), whereas in most countries, including Brazil, dogs display high seroprevalence but rarely present high parasitaemia levels (Roque *et al.* 2008; Pineda *et al.* 2011; Xavier *et al.* 2012). With regard to small mammals, a considerable number of marsupial and rodent species have been found naturally infected (World Health Organization, 2002). From these, species of the opossum genus *Didelphis* have been generally pointed out as the main reservoir, mostly due to the fact that studies focused mainly on this synanthropic genus, thus discounting other mammal species that may compose the *T. cruzi* reservoir system within a given area.

Little is known about the role of carnivores in the *T. cruzi* transmission network, probably because the examination of free-ranging carnivores requires long-term and technically challenging studies. Data are available for 2 Procyonidae species, the raccoon (*Procyon lotor*) and the ring-tailed coati (*Nasua nasua*) (Herrera *et al.* 2008; Kribs-Zaleta, 2010), but for wild canid and felid species, the only available information is that they are exposed to the *T. cruzi* transmission cycles in different environments, as expressed by positive serological tests (Brown *et al.* 2010; Herrera *et al.* 2011). In essence, carnivores have

great potential to be important reservoirs due to the high diversity in their ecological niches that might range from insectivorous to carnivorous diet in different forest strata and habitats (Nowak, 2005), favouring contact with different components of the *T. cruzi* transmission net. Besides, top predators can be bioaccumulators of parasites (Cleaveland *et al.* 2006), and this may be also the case for *T. cruzi*, since the oral transmission is a highly efficient route for this parasite. Along with their huge biomass and broad home range, these characteristics give them a great potential to amplify and spread the parasite populations.

The Serra da Canastra National Park (SCNP) is a natural landscape conservation unit in Minas Gerais state, one of the oldest known endemic areas for Chagas disease in Brazil. Herein, the aim of this study was to evaluate *T. cruzi* transmission in both peridomestic and sylvatic environments in the SCNP region. The role played by the different components of the *T. cruzi* reservoir net: wild carnivores, small mammals and sympatric domestic dogs and the maintenance of distinct *T. cruzi* lineages in the area are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was conducted within the Serra da Canastra National Park–SCNP (UTM 23K 345499/7764402) and adjacent areas, in Minas Gerais state, southeastern Brazil (Fig. 1). It is an important remnant of the Cerrado biome and shelters huge populations of some vulnerable mammalian species, such as the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). Many streams and rivers, including the São Francisco river, originate in the highlands of the SCNP. The vegetation is basically made up of highland grasslands, with some spots of stone fields, scrub savanna and riparian vegetation occurring sparsely alongside the river courses. The altitude varies from 700 to 800 meters above sea level in valleys and above 1000 meters on the plateau. The climate is tropical, the dry season occurs from March to October and the wet season from November to February. Annual rain precipitation ranges from 1200 to 1800 mm and average temperature is around 22–23 °C (IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, 2005).

The park was created in 1972 with a total area of 2000 ha of which only 715 ha are managed by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), whereas the remaining areas are still privately owned. The park is surrounded by small rural properties (<100 ha) whose economy is based on cattle ranching for artisanal cheese production and coffee plantations. Total rural population is 5500 inhabitants (Bizerril *et al.* 2011).

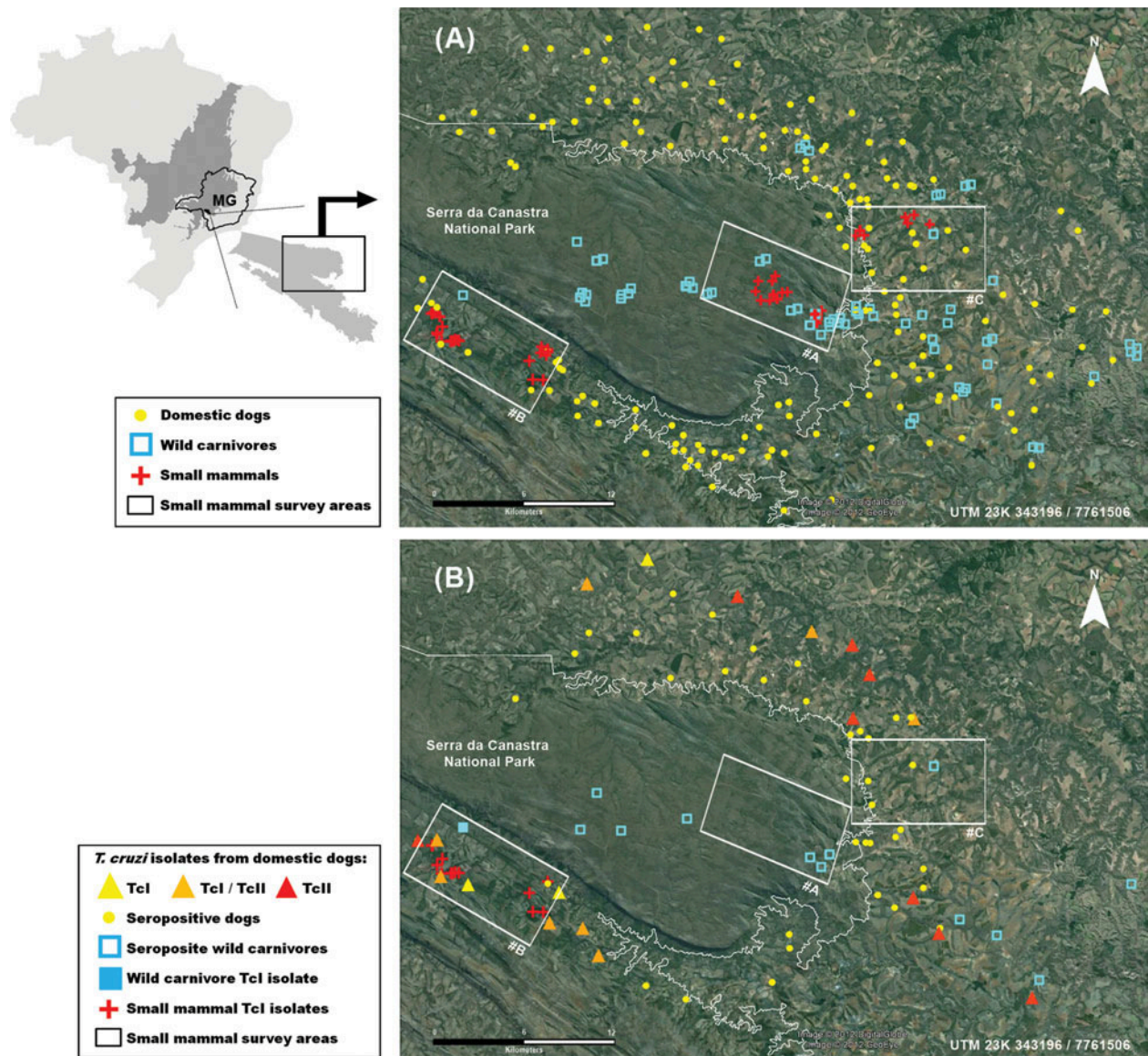


Fig. 1. Map of the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from Serra da Canastra National Park (SCNP) and its surroundings. (A) All mammals sampled; (B) *T. cruzi* infected mammals. Triangles represent domestic dog isolates (genotypes according to the figure legend); blue squares represent infected wild carnivores and red crosses represent infected small mammals. The white squares indicate small mammal survey areas: #A – within SCNP, #B – Vão dos Cândidos region and #C – Cerradão/São Roque region. In the upper left figure the study site in Brazil, the grey shade corresponds to the limits of the Cerrado biome and the black contour shows Minas Gerais state (MG) limits.

Dog surveys

A house-to-house census of dogs was undertaken in farms located 5 to 20 km from the park border during annual rabies vaccination campaigns from 2007 to 2010. The annual average domestic dog population for the 4 years follow-up was 557 ± 59 individuals. After owner consent, blood samples were collected by puncture of the cephalic vein through a Vacutainer® system. Age class was based on the owner information and confirmed with dental condition status. We considered as juveniles dogs younger than 6 months and adults as the dogs older than that.

Our sample included 214 dogs, composed by 177 adults and 39 juveniles, ranging from 3 months

to 14 years. The sex ratio was 3:1 (161 males/53 females). In the calculation of the prevalence of *T. cruzi* infection, resampled infected dogs were counted once.

The majority of adult dogs (71%) were used in cattle raising and slept outside the house. Owners also reported that their dogs hunt and that they go out by themselves for several consecutive days. The juvenile dogs were reported to be restricted only to peridomestic areas.

Capture of wild mammals

Wild carnivores. These were captured from March 2007 to August 2011 using box traps made with

galvanized wire mesh baited with sardine and boiled chicken. Traps were disposed both inside the park and on adjacent farmlands. We immobilized the animals with an intramuscular injection of a combination of zolazepan and tiletamine (Zoletil®) at dosages of 3 mg/kg for maned wolves, 8.3 mg/kg for ocelots (*Leopardus pardalis*) and 10 mg/kg for hoary foxes (*Lycalopex vetulus*) and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). We also used a subcutaneous injection of 0.04 mg/kg of atropine sulphate, whenever necessary. Anaesthetized animals were weighed, measured and had their teeth condition assessed in order to estimate age and were marked with ear-tags or radiocollars for individual identification. We took blood samples by puncture of the cephalic vein stored in Vacutainer® tubes for haemoculture and serological tests. Animals were released at the site of capture after recovery from anaesthesia. Total capture effort was 3819 traps/night.

Small wild mammals. These were captured using live traps (Sherman® – H. B. Sherman Traps, Tallahassee, FL, USA and Tomahawk® Tomahawk Live Traps, Tomahawk, WI, USA) baited with a mixture of banana, peanut butter, oat, bacon/sardines. Traps were set for 5 consecutive nights along linear transects, placed on the ground at 10 m intervals and alternating between trap type, in 3 field expeditions (May 2010, February 2011 and August 2011). Traps were placed into distinct habitat types inside SCNP (gallery forest, stone fields, savanna, and grasslands) as well as in 2 vicinal regions under anthropogenic influence, ‘São Roque/Cerradão’ and ‘Vão dos Cãndidos’. The last region is within the official limits of the SCNP, but not managed as a conservation unit, since there are still several privately owned farmlands. Total capture effort was 3126 traps-nights, equally distributed among the 3 expeditions. We calculated the relative abundance of small mammals as the number of individuals of each species divided by the total number of individuals multiplied by 100. Identification of specimens was based on external and cranial morphological characters and on karyological analyses as described by Bonvicino *et al.* (2005). Voucher specimens were deposited in the Mammal Collection of the National Museum – UFRJ (Rio de Janeiro, Brazil). Blood samples were collected by cardiac puncture after anaesthesia with an intramuscular injection of ketamine (10–30 mg/kg) associated with acepromazine (5–10 mg/kg) for rodents (proportion 9:1) or xylazine (2 mg/kg) for marsupials (1:1).

All animal handling procedures followed the Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research (Sikes and Gannon, 2011). The project had permission from the Brazilian government environmental agency (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) (SISBIO license

number 18635–3) and was endorsed by the ethics committee of the Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ (CEUA P-292–06), in accordance to Brazilian regulations. Appropriate biosecurity techniques and individual protection equipment were used during all procedures involving animals and biological sample collecting and handling.

Trypanosoma cruzi infection

The *T. cruzi* infection survey was performed by parasitological and/or serological methods. If insufficient blood was collected, priority was given to haemoculture. Parasitological tests were based on examination of fresh blood smears (microscopic analysis) and haemoculture (HC), the latter performed as follows: 0.3 ml of blood from each animal was cultured in 2 tubes containing Novy-McNeal-Nicole (NNN) medium with liver infusion tryptose (LIT) overlay. Tubes were examined every 15 days up to 5 months. When positive, parasites were amplified, cryopreserved and deposited in the Collection of Trypanosomatids from wild mammals, domestic animals and vectors – COLTRYP (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil).

For the detection of anti-*T. cruzi* IgG antibodies in sera we used the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) as previously described by Camargo (1966) and the Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA, Biomanguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil). We also searched for IgM antibodies through the IFAT to identify recent *T. cruzi* infection among HC-positive dogs and other dogs from the same farms. The antigen used in serological assays for all species was obtained from a *T. cruzi* isolate derived from dogs of this study area harvested from axenic culture. For small mammals, rodent sera were tested with a commercial anti-rat IgG conjugate (FITC, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), whereas marsupial sera were tested with an intermediary anti-opossum serum raised in rabbits followed by a commercial anti-rabbit conjugate. Wild canids and felids were tested using domestic dog and cat conjugates, respectively. The cut-off value titre adopted for IFAT was 1:40 for dogs and marsupials and 1:10 for rodents (Herrera *et al.* 2005). The cut-off value for ELISA was optical absorbance ≥ 0.200 mean ± 3 S.D. For wild carnivores, the test was performed with a non-specific conjugate and since there are no available data on IFAT cut-off values for some carnivore species of this study, we performed a PCR in all ELISA-positive serum samples besides a subsample of ELISA negative samples ($n=5$). Therefore, the cut-off value adopted was 1:20, as it was the lowest serum dilution in which parasites could be detected by PCR. Each reaction included 2 positive and 2 negative control sera.

In order to detect mixed-infection and/or cross-reaction with *Leishmania* spp. we performed an

IFAT test using *L. infantum* and *L. braziliensis* parasites harvested from axenic culture as antigens (cut-off: 1:40). For wild and domestic canids, we also used the Rapid Test for Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (TR DPP[®], BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil).

Samples were considered positive when parasites were isolated by HC or when the sera showed reactivity in at least 2 of the serological tests. Samples that had IFAT-IgG concomitant positive values for *T. cruzi* and *Leishmania* sp. with non-corresponding ELISA, DPP or that displayed borderline results were attributed to cross-reaction and were considered indeterminate.

Trypanosoma cruzi molecular characterization

Genomic DNA was extracted from cultures and wild carnivore serum samples using standard phenol-chloroform protocols (Vallejo *et al.* 1999). Characterization was carried out in 3 steps: (1) multiplex PCR amplification of the mini-exon gene following conditions described by Fernandes *et al.* (2001) for the identification of 3 DTU *T. cruzi* groups: Tc1 (TcI–200 basepairs), Tc2 (TcII/TcV/TcVI–250 basepairs) and Zymodeme 3 (TcIII/TcIV–150 basepairs), besides *T. rangeli* (100 basepairs) or mixed infections; (2) PCR amplification of nuclear 1f8 gene followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of fragments digested by Alw21I enzyme (Rozas *et al.* 2007) to discriminate TcII from hybrids (TcV and TcVI) DTUs in isolates previously typed as Tc2 or mixed Tc1/Tc2 in mini-exon assays and (3) PCR-RFLP of histone H3/AluI (Westenberger *et al.* 2005) to rule out hybrids (TcV and TcVI) in mixed Tc1/Tc2 infections, as it could possibly overlap digested fragments in 1f8/Alw21I assay. Both PCR-RFLP 1f8/Alw21I and histone H3/AluI were performed with minor modifications in the conditions described by Rozas *et al.* (2007). Each reaction included a negative control and positive control samples from those *T. cruzi* strains representing the DTUs to be typed. PCR products were visualized in 2% agarose gel after ethidium bromide staining and visualized under ultraviolet light.

Spatial and statistical analyses

In order to verify the spatial distribution of trypanosomatid infection, locations of each individual captured were accessed through a hand-held GPS receiver using the WGS 84 Datum geodetic coordinate system. Locations were analysed in a Geographic Information System platform using GPS trackmakerPRO[®] software (Geostudio Tecnologia, Brazil) juxtaposed on a base map modified from Google earth[®] software (v. 6.2, Google Inc., USA)

To examine the distribution pattern of *T. cruzi*-infected dogs, the mean geographical distance was compared among infected dog locations ($n=76$) to the mean distance distribution across 10 000 randomly assigned samples of the same size using R 2.13 software. Spatial autocorrelation of seropositive dogs was tested with Moran's I. Maps with discriminated locality of infected hosts and parasite genotypes were also prepared. Statistical tests were conducted with $\alpha=0.05$.

The degree of concordance between IFAT-IgG and ELISA assays was assessed by the kappa statistic using SYSTAT 11 for Windows. To test for the influence of sex and age class on *T. cruzi* infection rates in dogs the 3-dimensional Chi-square contingency table was used. We also compared the *T. cruzi* infection among domestic dogs, carnivores, rodents and marsupials and applied a Chi square test to verify whether infection rate is independent of taxonomic group.

RESULTS

Trypanosoma cruzi infection in dogs

Dogs are included in a well-established *T. cruzi* transmission cycle in all the geographical regions surrounding the Serra da Canastra National Park, as demonstrated by the high parasitological and serological *T. cruzi* infection prevalence (Table 1, Fig 1).

Trypanosoma cruzi was isolated from the blood of 19 dogs (7.9%, $n=214$), collected on the same expedition (September/2010). Genotyping revealed the presence only of 2 main *T. cruzi* lineages: TcI ($n=3$) and TcII ($n=8$), besides mixed TcI/TcII infections ($n=8$) (Figs 1 and 2). After 5 months, we re-examined 10 out of the 19 dogs that previously displayed positive HC and none of them tested positive. Among the remaining HC-positive dogs, 6 died and 3 disappeared.

Prevalence was calculated considering the total number of examined dogs during the study. A total of 63 dogs (29.4%) were seropositive for *T. cruzi* (Table 1), including 8 (12.7%) individuals that were co-infected with *Leishmania* sp. Once infected, *T. cruzi*-positive testing dogs maintained serological titres, as observed during re-sampling. Seventeen dog samples were considered indeterminate by the serological assays. We found no significant difference in the *T. cruzi* infection rate between the dogs' sex or age class (Chi square = 2.69; D.F. = 7; $P=0.9$). The agreement between IFAT-IgG and ELISA was 78% with a kappa value of 0.522 (moderate agreement). ELISA presented higher sensitivity to detect the dog's acute phase since it was positive in 15 out of 19 HC-positive dogs, whereas IFAT detected infection in only 4 of them.

Six juvenile dogs (3–6 months old) displayed positive HC, demonstrating that *T. cruzi*

Table 1. *Trypanosoma cruzi* infection assessment through serology (IgG – IFAT/ELISA) and haemoculture (HC) in mammals from the Serra da Canastra National Park and surrounding areas, Brazil

Species (common name)	N	Capture location ¹	Small mammals relative abundance (%) ²	Serology (Positive/N)	HC (Positive/N)	Genotype
<i>Akodon montensis</i>	27	a,b	20.0	0/17	1/27	TcI
<i>Akodon</i> spp. ³	13	a,b	9.6	0/5	1/13	TcI
<i>Calomys</i> spp. ⁴	14	b	10.4	0/3	3/14	TcI
<i>Cerradomys subflavus</i>	15	a,b	11.1	0/13	4/15	TcI
<i>Necomys lasiurus</i>	28	a,b	20.7	0/21	0/28	–
<i>Nectomys squamipes</i>	3	a,b	2.2	0/3	0/3	–
<i>Oligoryzomys</i> spp. ⁵	4	a,b	3.0	0/2	0/4	–
<i>Oxymycterus delator</i>	9	a,b	6.7	1/8	0/9	–
Total rodents	113		83.7	1/72 (1.4%)	9/113 (7.9%)	–
<i>Caluromys philander</i>	1	b	0.7	0/0	1/1	TcI
<i>Didelphis albiventris</i>	4	a,b	3.0	0/4	0/4	–
<i>Gracilinamus agilis</i>	4	a	3.0	0/2	0/4	–
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	1	a	0.7	0/1	0/1	–
<i>Marmosops incanus</i>	5	b	3.7	4/4	3/5	TcI
<i>Monodelphis</i> spp. ⁶	7	a,b	5.2	2/5	0/7	–
Total marsupials	22		16.3	6/16 (37.5%)	4/22 (18.1%)	–
<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Maned wolf)	39	a,b	–	8/39	0/30	–
<i>Cerdocyon thous</i> (Crab-eating fox)	8	a,b	–	4/8	0/3	–
<i>Lycalopex vetulus</i> (Hoary fox)	10	a,b	–	0/10	0/6	–
<i>Leopardus pardalis</i> (Ocelot)	1	b	–	1/1	1/1	TcI
<i>Conepatus semistriatus</i> (Skunk)	2	a,b	–	0/0	0/2	–
Total wild carnivores	60		–	13/58 (22.4%)	1/42 (2.4%)	–
<i>Canis lupus familiaris</i> (Dog)	214		–	63/214 (29.4%)	19/214 (7.9%)	TcI (3) TcII (8) TcI-TcII (8)

¹ Capture location site: a, SCNP; b, Farmlands; (–), not applicable.

² Number of individuals of each species divided by the total number of individuals * 100.

³ *Akodon* sp. (n=6; a, b), *A. lindberghi* (n=5; a), *A. cursor* (n=1; a).

⁴ *Calomys* sp. (n=3; b) *C. tener* (n=11; b).

⁵ *Oligoryzomys* sp. (n=2, b), *O. nigripes* (n=1; a), *O. rupestris* (n=1; a).

⁶ *Monodelphis americana* (n=3; b), *M. domestica* (n=3; b) and *M. sorex* (n=1; a).

transmission also occurs within the peridomestic environment. An active transmission in that region was confirmed by, among other factors, the serological conversion observed in 4 dogs 1 year after the first examination and the 4 HC-positive dogs that displayed concomitant positive IFAT-IgM, indicative of recent infection. Further, 28.3% (n=46) of the dogs amid farms with HC-positive dogs had IFAT-IgM antibodies (corroborated by ELISA), suggestive of recent infection in this scenario. The *T. cruzi* infection in dogs was spatially autocorrelated (Moran's I: observed=0.674; expected=–0.004; s.d.=0.076; P-value=0) and not homogeneously distributed (P<0.004), suggesting that transmission occurred throughout the SCNP surrounding areas, though with hotspot transmission foci (Fig. 1, and see Supplementary Material, online version only).

Trypanosoma cruzi infection in wild mammals

A total of 60 wild carnivores belonging to 5 species were examined for *T. cruzi* infection. The only felid species examined, the ocelot, tested positive both in fresh blood preparations and at the first HC reading (7 days after blood culture) along with an elevated serology titre (1:160); altogether indicative of high parasitaemia levels. The ocelot's *T. cruzi* isolate was genotyped as TcI (Table 1).

The wild canids were exposed to infection as demonstrated by serology but none were parasitologically positive by HC suggesting they may not be infective to vectors. The crab-eating fox had the highest serum prevalence rate (50%–4/8) followed by the maned wolf (20.5%–8/39) (Table 1). Titres ranged from 1:20 to 1:80 (IFAT). All hoary fox samples were seronegative. Three (5.8%) maned wolf

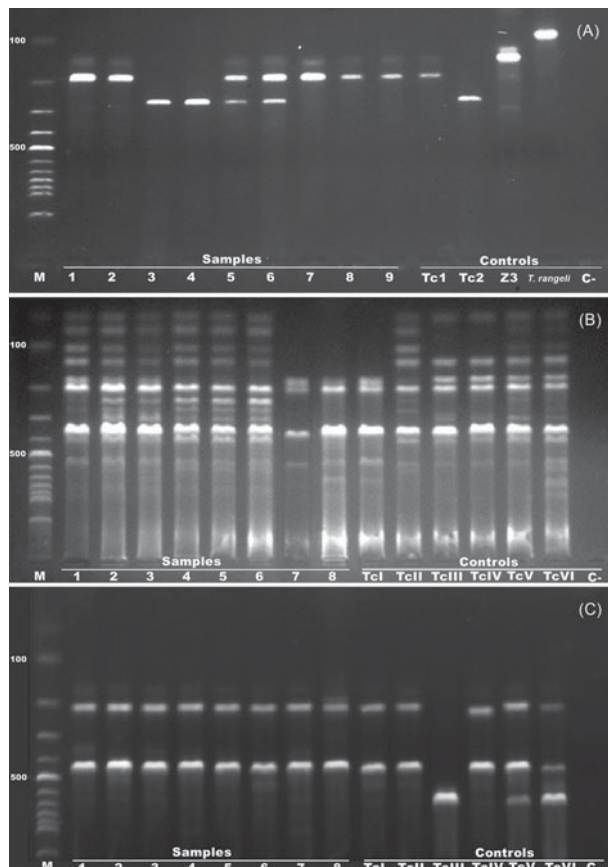


Fig. 2. *Trypanosoma cruzi* genotyping of domestic and wild mammal isolates from the Serra da Canastra National Park and surroundings, Brazil. (A) PCR products of the Mini-exon gene analysed by agarose electrophoresis gel stained with ethidium bromide. Lanes: M, Molecular weight markers (100 bp DNA ladder); 1–6, dog isolates; 7, wild carnivore isolate (*Leopardus pardalis*); 8, rodent isolate (*Akodon montensis*); 9, marsupial isolate (*Marmosops incanus*); Control samples: Tc1 (TcI – 200 bp), Tc2 (TcII/TcV/TcVI – 250 bp), Z3 (TcIII/TcIV – 150 bp), *T. rangeli* (100 bp). (B) PCR-RFLP products of 1f8 gene/Alw21I. Lanes: 1–3, dog isolates characterized as mixed Tc1/Tc2 in Mini-exon gene assay; 4–6, dog isolates characterized as Tc2; 7–8, dog isolates characterized as Tc1. Control samples: PCR-RFLP 1f8/Alw21I digestion patterns of TcI to TcVI. (C) PCR-RFLP products of histone H3/AluI. Lanes: 1–8, dog isolates characterized as mixed Tc1/Tc2 infection in Mini-exon gene assay. Control samples: PCR-RFLP H3/AluI digestion patterns of TcI to TcVI.

samples were considered indeterminate. The agreement between IFAT-IgG and ELISA was 82% with a kappa value of 0.628 (substantial agreement). The 2 specimens of the skunk (*Conepatus semistriatus*) examined only by HC tested negative.

Concerning the small mammals, relative abundances and fauna richness were comparable inside SCNP and farmlands (Table 1). The marsupials displayed high parasitaemia levels, mainly *Marmosops incanus* since 3 out of 4 seropositive individuals were positive on both fresh blood

examination and HC. Positive HC was also achieved from the only captured *Caluromys philander*. Infection by IFAT was detected in the marsupial species *Marmosops incanus*, *Monodelphis americana* and *Monodelphis domestica* (prevalence of 37.5%), titres ranged from 1:40 to 1:320. Rodents from *Akodon*, *Calomys* and *Cerradomys* species also presented parasitaemias detected by HC in 9 individuals (Table 1). Of these positive rodents, we could collect sufficient blood to perform the IFAT assay from only 3 that tested negative. One *Oxymycterus delator* was the only seropositive sample (prevalence of 1.4%). The small mammal isolates were all characterized as TcI (Table 1, Fig. 1).

All *T. cruzi*-infected small mammals were collected in the 'Vão dos CÂndidos' region as well as the infected ocelot (Fig. 1). The infected crab-eating foxes and 4 maned wolves were captured in farmland regions. Four serologically positive maned wolves displayed home range areas exclusively inside the SCNP, as confirmed by our parallel observations using radio telemetry techniques (May-Junior *et al.* 2009).

Comparing the 2 farmland areas, in the 'Vão dos CÂndidos' region both small mammals and dogs presented high prevalence of positive HC (13/65–20% and 6/25–24%, respectively) whereas in the 'Cerradão/São Roque' region, neither small mammals ($n=7$) nor dogs ($n=21$) displayed positive HC. Overall, the proportion of *T. cruzi* infection varied significantly in different taxonomic groups. Domestic dogs tended to have more positive diagnoses than predicted by chance, whereas rodents had fewer positive diagnoses (Chi square = 21.56; D.F. = 3; $P<0.001$).

DISCUSSION

In the present study we describe a well-established and broadly distributed *T. cruzi* cycle in all geographical regions surrounding SCNP, which includes wild and domestic animals. The presence of dogs with high parasitaemia, as demonstrated by positive haemoculture (HC), contrasts with previous studies in Brazil, in which none or a minority of individuals displayed positive HC (Herrera *et al.* 2005; Roque *et al.* 2008; Xavier *et al.* 2012). The herein positive HC dogs reflect probably the initial phase of infection, typically characterized by a short period of detectable parasitaemia (Machado *et al.* 2001). A similar pattern in naturally infected dogs was observed in Monte Alegre, in the state of Pará, in Northern Brazil (Xavier *et al.* 2012). Besides, serological conversion observed during the follow up attested that they are continually being exposed to *T. cruzi* infections.

Dogs may become infected by the contaminative route (Gurtler *et al.* 2007) or by ingesting infected triatomines, a highly efficient transmission route

(Pineda *et al.* 2011). Another possible infection route might be by hunting of infected small mammals (Herrera *et al.* 2011). Actually, with regards to the 2 areas where we simultaneously sampled for small mammals and dogs, dog infection was coincident with small mammal infection. In the SCNP, *T. cruzi* transmission might occur not only in the wild, but also in the peridomestic environment, as demonstrated by the infected juvenile dogs. Herein, besides acting as sentinel hosts, as already described in other Brazilian areas (Xavier *et al.* 2012), dogs were also able to signal the presence of the 2 main *T. cruzi* genotypes in the area, TcI and TcII.

In the SCNP, the huge distance among the infected dogs along with the fact that the foci of peridomestic vectors are residual and submitted to regular spraying rule out the existence of a *T. cruzi* transmission cycle supported solely by dogs. Thus, the finding of TcII genotype infecting only dogs, contrasting with TcI which was also found infecting wild mammals is an apparent paradox. At a first glance the explanation could rely on TcII circulation exclusively in mammalian groups not sampled in this study, such as armadillos and bats (Yeo *et al.* 2005; Lisboa *et al.* 2008). However, this seems an oversimplified explanation; a similar picture was observed in a Chagas Disease outbreak in Santa Catarina state, where TcII was found in humans and triatomines but not in the mammalian fauna (Roque *et al.* 2008; Steindel *et al.* 2008). Moreover, reports of TcII in different wild mammal species and biomes demonstrate that this genotype is also maintained in wild cycles (Lisboa *et al.* 2006; Herrera *et al.* 2008). This raises the question on where the TcII is hidden in nature. This could reflect the transmission strategy of this genotype. In analogy with the r-k ecological selection theory, the parasitaemia curve of TcII within its mammal hosts resemble an r strategist – one precocious and short period of high parasitaemia (Andrade and Magalhaes, 1996) and ultimately would impact on the dispersion strategy of this genotype in the wild. This kind of strategy does not impede TcII transmission in the wild, but hampers parasite detection, as a consequence, it may be underestimated in nature. Further, we cannot rule out the oddities in host-parasite interactions. For instance, the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*) maintains long-lasting TcII infection with high prevalence of positive HC throughout (Lisboa *et al.* 2006), whereas the opossum *Didelphis aurita* can control and even eliminate TcII in experimental conditions (Jansen *et al.* 1991). Here, we report for the first time TcII isolation and molecular characterization in dogs from Brazil, a well-studied *T. cruzi* host. This reinforces the view that the spectrum of mammal host infected by this genotype is currently underestimated.

Undoubtedly, from our results, none is more puzzling than the high number of dogs in early stages

of infection in broadly distributed and unlinked areas simultaneously. This raises the idea that still unknown variables must be involved in the dispersion of *T. cruzi* among several host species and that these variables are included in a broader phenomenon. For instance, only recently El Niño Southern Oscillation (ENSO) and similar phenomena have been taken into account to influence living organisms (Hanf *et al.* 2011). Whatever the cause, the frequent occurrence of unsolved questions in biological systems may be related to our limitation in analysing them detached from a linear, Cartesian focus. Parasitic transmission nets are clearly complex systems since they are essentially dynamic, multivariate, non-linear and unpredictable, rendering a reductionist and deterministic focus interpretation of this phenomenon worthless. Indeed focusing these phenomena in the light of the chaos theory could perhaps fill the several gaps in the current knowledge of this issue (Mazzocchi, 2008). Taking into account the presence of several dogs geographically separated and recently infected by *T. cruzi* may be a stochastic phenomenon, or the signal that the maximum transmission fitness was achieved in that moment; indeed, a feature described to be the characteristic of the edge of the chaos.

The role of each wild mammal species in the *T. cruzi* transmission networks will depend on the ability of the parasite to be transmitted to its vector, as well as the abundance and distribution of its mammal host species. In SCNP, rodents and marsupials were shown to be equally important for the maintenance of *T. cruzi*. The marsupials, regardless of their low relative abundance, displayed high prevalence of positive HC, in particular the arboreal *Marmosops incanus* and *Caluromys phlander*. Rodents also displayed positive HC, mainly in highly abundant species, i.e. the terrestrial *Akodon montensis* and *Cerradomys subflavus*, pointing to the epidemiological importance of these mammals in the local transmission net. Moreover, *T. cruzi* infection was spread among terrestrial and arboreal mammals, demonstrating that parasite transmission was occurring in both strata. We observed high *T. cruzi* infection rates in the area despite the low relative abundance of the common *Didelphis* genus, generally described as one of the most important and competent mammalian reservoir of the parasite (Yeo *et al.* 2005). This emphasizes the characteristic dynamics of *T. cruzi* transmission cycles that should be examined as an unique ecological system.

Herein, we observed that 3 wild carnivore species, the ocelot, the crab-eating fox and the maned wolf were infected by *T. cruzi* in the SCNP region, but they probably play distinct roles as a result of their pattern of *T. cruzi* infection and peculiar ecological characteristics. The ocelot was the only carnivore that displayed patent parasitaemia (positive fresh blood examination and HC). To the best of our knowledge this is the first report of an ocelot naturally infected

with *T. cruzi*. In comparison to the other 2 carnivore species of this study, the ocelot is the one which better exemplifies the bioaccumulator role in a prey-predator chain since it has a more carnivorous diet, consuming mainly small mammalian prey, besides birds (Rocha-mendes *et al.* 2010). In fact, this infected ocelot was the only carnivore captured in the 'Vão dos Cãndidos' region, where small mammals displayed high parasitaemia levels. Probably, *T. cruzi* infection in top predators with a more restricted carnivorous diet, such as the ocelot, is highly dependent on the prevalence of infection of the local mammal fauna that can be preyed, since infection by the contaminative route is less probable if we consider that this animal is nocturnal, very active and generally does not use dens (except during birthing). In the Pantanal, where small mammals had low infection rates, none of the 10 ocelots tested were positive in HC (Herrera *et al.* 2011).

The crab-eating fox seems to be highly exposed to *T. cruzi* infections, as demonstrated in this study and also in the Pantanal region of Brazil (Herrera *et al.* 2011). This might be related to its capacity to exploit different ecological niches. The crab-eating fox is known to be one of the most plastic carnivore species: it has an omnivorous diet—including insects and small mammals, opportunistic behaviour and is a habitat generalist (Juarez and Marinho, 2002). Also, it has great flexibility in the use of disturbed habitats (Michalski *et al.* 2006). These traits increase the probability of contact with a variety of components of the *T. cruzi* cycle pointing the crab-eating fox as a good sentinel for *T. cruzi* transmission areas.

The maned wolves were highly exposed and can also be considered a good sentinel for transmission. Accounting for its omnivorous diet and home range areas of 80 km² on average (Jacomio *et al.* 2009), this species can play a unique role that is to signal the transmission in large areas, in particular in wild environments which are generally difficult to access. This was the case of maned wolves from our study that signalled the *T. cruzi* transmission both inside SCNP and its surroundings. The distinct prevalence rates between them indicate that the transmission was occurring mostly outside of the conservation unit, given that only 16% (4/25) of the maned wolves that were captured and recaptured within the park area over the 5-year follow-up tested positive, whereas 28% (4/14) of the wolves from outside SCNP tested positive. Taken together with the finding that no other mammal captured inside the park was positive for *T. cruzi* infection, we can conclude that the *T. cruzi* cycle inside SCNP is less expressive than in its surroundings.

This study reports the current *T. cruzi* enzootic transmission in one of the oldest endemic areas for Chagas disease in Brazil. We surmise that the *T. cruzi* transmission is well established all around the SCNP region, and that this transmission includes

2 genotypes of the parasite: TcI and TcII. Therein, dogs, small mammals and carnivore species were shown to participate in the *T. cruzi* transmission net and parasite transmission was occurring in both arboreal and terrestrial strata, as well as in the peridomicile. An understanding of the peculiar characteristics of this net, as well as each host-parasite relationship, is the key to identify the risk of disease outbreaks. This is the first study to corroborate evidence that dogs can be used not only to report *T. cruzi* transmission areas but also the genotypes present in the area, which reinforces their role as sentinels for surveillance programmes. The observed *T. cruzi* eco-epidemiological profile should increase awareness of the necessity for continuous surveillance in order to prevent re-emergence of Chagas disease in this area.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to Dr Vera Bongertz for revising the English version, Carlos A. Zucco for his help with statistical analysis and the three anonymous referees for their helpful suggestions. We are grateful to Moema Camoleze, Gregor Daflon, Caio Motta, Camylla Pereira, Vitor Araújo, João Batista, Fabiano Fernandes, Dayana Motta and Nikolaos Dimitriadis for their assistance during fieldwork. We are also grateful to Marcos Lima, Carlos Ruiz, Kerla Monteiro, Juliana Barros and Cinthia Gomes for excellent laboratory work. The authors thank Darlan Padua, Luciano and all workers from SCNP/ICMBio office as well as Aparecida Elorde from the Municipal Department of Health of São Roque de Minas for logistic support and information. Special thanks to all the partners of the Maned Wolf Conservation Project that made this work possible, especially to Marcelo Bizerril, Flávio Rodrigues, Rogério de Paula, Ronaldo Morato, Nucharin Songsasen, Eduardo Eizirik, Carla Cruz, Kátia Leal, Wanila Santos and Pró-canívoros Institute.

FINANCIAL SUPPORT

Wildlife Conservation Society—OWOH 2008-001. European Union Seventh Framework Program Grant—ChagasEpiNet 223034. National Research Center for the Conservation of Natural Predators—CENAP/ICMBio. Research Foundation of the Minas Gerais State—FAPEMIG 07/2009 PDJ-CNPq500091/2010-2. A doctoral grant was provided by CAPES to F.L.R.

REFERENCES

- Andrade, S. G. and Magalhaes, J. B. (1996). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **30**, 27–35.
- Araujo, C. A., Wanick, P. J., Xavier, S. C. and Jansen, A. M. (2011). Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Experimental Parasitology* **127**, 308–312. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.013.
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* **14**, 523–532. doi: 0738–081X(96)00041-7
- Bizerril, M. X. A., Soares, C. C. and Santos, J. P. (2011). Linking community communication to conservation of the maned wolf in central Brazil. *Environmental Education Research* **17**, 815–827.
- Bonvicino, C. R., Lemos, B. and Weksler, M. (2005). Small mammals of Chapada dos Veadeiros National Park (Cerrado of Central Brazil): ecologic,

- karyologic, and taxonomic considerations. *Brazilian Journal of Biology* **65**, 395–406. doi: S1519-69842005000300004.
- Brown, E. L., Roellig, D. M., Gompper, M. E., Monello, R. J., Wenning, K. M., Gabriel, M. W. and Yabsley, M. J.** (2010). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among eleven potential reservoir species from six states across the southern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **10**, 757–763. Doi: 10.1089/vbz.2009.0009
- Camargo, M. E.** (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* **8**, 227–235.
- Cleaveland, S., Meslin, F. X. and Breiman, R.** (2006). Dogs can play useful role as sentinel hosts for disease. *Natur, Londone* **440**, 605. Doi: 10.1038/440605b
- Fernandes, O., Santos, S. S., Cupolillo, E., Mendonca, B., Derre, R., Junqueira, A. C., Santos, L. C., Sturm, N. R., Naiff, R. D., Barret, T. V., Campbell, D. A. and Coura, J. R.** (2001). A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**, 97–99.
- Gurtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U. and Cohen, J. E.** (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* **134**, 69–82. Doi: http://dx.doi.org/10.1017/S0031182006001259.
- Hanf, M., Adenis, A., Nacher, M. and Carme, B.** (2011). The role of El Niño Southern Oscillation (ENSO) on variations of monthly *Plasmodium falciparum* malaria cases at the Cayenne General Hospital, 1996–2009, French Guiana. *Malaria Journal* **10**, 100. doi: 10.1186/1475-2875-10-100.
- Herrera, H. M., Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Olifiers, N., Bianchi, R. C., Rocha, F. L., Mourao, G. M. and Jansen, A. M.** (2008). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 1133–1139. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.04.041.
- Herrera, H. M., Rocha, F. L., Lisboa, C. V., Rademaker, V., Mourao, G. M. and Jansen, A. M.** (2011). Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **105**, 380–387. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.04.008.
- Herrera, L., D'Andrea, P. S., Xavier, S. C., Mangia, R. H., Fernandes, O. and Jansen, A. M.** (2005). *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **99**, 379–388. doi: 10.1016/j.trstmh.2004.07.006.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis** (2005). *Plano de manejo do Parque Nacional da Serra da Canastra*. IBAMA, Brasília.
- Jacomo, A. T. D., Kashivakura, C. K., Ferro, C., Furtado, M. M., Astete, S. P., Torres, N. M., Sollmann, R. and Silveira, L.** (2009). Home range and spatial organization of maned wolves in the Brazilian grasslands. *Journal of Mammalogy* **90**, 150–157. Doi: http://dx.doi.org/10.1644/07-MAMM-A-380.1.
- Jansen, A. M., Leon, L., Machado, G. M., da Silva, M. H., Souza-Leao, S. M. and Deane, M. P.** (1991). *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: parasitological and serological follow-up of the acute infection. *Experimental Parasitology* **73**, 249–259. doi: 0014-4894(91)90096-F.
- Juarez, K. M. and Marinho, J.** (2002). Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. *Journal of Mammalogy* **83**, 925–933. doi: http://www.jstor.org/stable/1383498.
- Kribs-Zaleta, C.** (2010). Estimating contact process saturation in sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e656. doi: 10.1371/journal.pntd.0000656.
- Lisboa, C. V., Mangia, R. H., Luz, S. L., Kluczkowski, A., Jr., Ferreira, L. F., Ribeiro, C. T., Fernandes, O. and Jansen, A. M.** (2006). Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology* **133**, 603–611. doi: 10.1017/S0031182006000722.
- Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Herrera, H. M., Gerhardt, M., Cupolillo, E. and Jansen, A. M.** (2008). *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary Parasitology* **156**, 314–318. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.06.004.
- Machado, E. M., Fernandes, A. J., Murta, S. M., Vitor, R. W., Camilo, D. J., Jr., Pinheiro, S. W., Lopes, E. R., Adad, S. J., Romanha, A. J. and Pinto Dias, J. C.** (2001). A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 958–965.
- May-Junior, J. A., Songsasen, N., Azevedo, F. C., Santos, J. P., Paula, R. C., Rodrigues, F. H., Rodden, M. D., Wildt, D. E. and Morato, R. G.** (2009). Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases* **45**, 81–90.
- Mazzocchi, F.** (2008). Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Reports* **9**, 10–14. doi: 10.1038/sj.embor.7401147.
- Michalski, F., Crawshaw, P. G., de Oliveira, T. G. and Fabian, M. E.** (2006). Notes on home range and habitat use of three small carnivore species in a disturbed vegetation mosaic of southeastern Brazil. *Mammalia* **70**, 52–57. Doi: 10.1515/MAMM.2006.004.
- Noireau, F., Diosque, P. and Jansen, A. M.** (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research* **40**, 26. doi: 10.1051/vetres/2009009.
- Nowak, R. M.** (2005). *Walker's Carnivores of the World*. The John Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Pineda, V., Saldana, A., Monfante, I., Santamaria, A., Gottdenker, N. L., Yabsley, M. J., Rapoport, G. and Calzada, J. E.** (2011). Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Veterinary Parasitology* **178**, 360–363. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.043.
- Rocha-mendes, F., Mikich, S. B., Quadros, J. and Pedro, W. A.** (2010). Feeding ecology of carnivores (Mammalia, Carnivora) in Atlantic Forest remnants, Southern Brazil. *Biota neotropical* **10**, 1–10.
- Roque, A. L., Xavier, S. C., da Rocha, M. G., Duarte, A. C., D'Andrea, P. S. and Jansen, A. M.** (2008). *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene* **79**, 742–749.
- Rozas, M., De, D. S., Adauí, V., Coronado, X., Barnabe, C., Tibyarenc, M., Solari, A. and Dujardin, J. C.** (2007). Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment–length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *The Journal of Infectious Diseases* **195**, 1381–1388. doi: 10.1086/513440.
- Shikanai-Yasuda, M. A. and Carvalho, N. B.** (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases* **54**, 845–852. doi: 10.1093/cid/cir956.
- Sikes, R. S. and Gannon, W. L.** (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* **92**, 235–253. Doi: 10.1644/10-MAMM-F-355.1.
- Steindel, M., Kramer, P. L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T. C., Stoco, P. H., Murta, S. M., de Carvalho-Pinto, C. J. and Grisard, E. C.** (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **60**, 25–32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E. and Macedo, A. M.** (1999). Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica* **72**, 203–212. doi: S0001-706X(98)00085-0.
- Westenberger, S. J., Barnabe, C., Campbell, D. A. and Sturm, N. R.** (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* **171**, 527–543. doi: 10.1534/genetics.104.038745.
- World Health Organization** (2002). *Control of Chagas disease*. WHO Technical Report Series No 905. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xavier, S. C., Roque, A. L., Lima, V. S., Monteiro, K. J., Otaviano, J. C., Ferreira da Silva, L. F. and Jansen, A. M.** (2012). Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1647. doi: 10.1371/journal.pntd.0001647.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., Lopez, E., Gonzalez, N., Patterson, J. S., Gaunt, M. W., de Arias, A. R. and Miles, M. A.** (2005). Origins of Chagas disease: Didelphid species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillo hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology* **35**, 225–233. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.024.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M. and Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 1051–1054. doi: S0074-02762009000700021.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G. and Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 240–253. doi: 10.1016/j.mee-gid.2011.12.009.