



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Avaliação do potencial de transmissão vetorial do *Trypanosoma cruzi* no estado do Rio Grande do Norte: aspectos epidemiológicos e taxonômicos de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)

ANDRESSA NORONHA BARBOSA DA SILVA

Belo Horizonte/MG
2017

Andressa Noronha Barbosa da Silva

Avaliação do potencial de transmissão vetorial do *Trypanosoma cruzi* no estado do Rio Grande do Norte: aspectos epidemiológicos e taxonômicos de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Prof. Dr. Egler Chiari

Co-orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão

Belo Horizonte/MG
2017

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS



Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, sob a orientação dos Professores Drs. Egler Chiari e Lúcia Maria da Cunha Galvão e no Laboratório de Referência de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas – LATEC Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ).

COLABORADORES

INSTITUTO RENÉ RACHOU – FIOCRUZ/MINAS

Dra. Liléia Diotaiuti

Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza

Dra. Silvia Ermelinda Barbosa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN

Centro de Ciências da Saúde

Profa. Dra. Antonia Claudia Jácome da Câmara

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Departamento de Parasitologia

Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos

Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Dr. João Luís Reis Cunha

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE PÚBLICA DO RIO GRANDE DO NORTE

Lúcia Maria Abrantes Aguiar

SUPORTE FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

MCTI/CNPq/MS-Decit No. 40/2012 – Pesquisa em Doenças Negligenciadas

Dedicatória

Aos meus amados pais, Anibal e Janice, pelo amor incondicional, confiança, paciência e, sobretudo, por compreenderem a minha ausência ao longo destes quatro anos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Egler Chiari**, por ter aceitado me orientar e desenvolver comigo este trabalho. Agradeço imensamente a oportunidade, a confiança, os conselhos e incentivos.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão**, pela oportunidade, atenção, cuidado, leitura da tese e manuscritos. Obrigada pela formação desde a iniciação científica e por ter aceitado trabalhar comigo numa área que era, até então, nova para você e ter seguido comigo até hoje.

À preciosa colaboração/orientação da **Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti** em todas as etapas deste trabalho. Agradeço imensamente os ensinamentos, a compreensão, o apoio e o carinho diário. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório no Instituto René Rachou para a realização deste trabalho.

À **Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza**, pela colaboração em todas as etapas deste trabalho e valiosas contribuições na escrita dos trabalhos e da tese. Agradeço imensamente o apoio, atenção, confiança, carinho, amizade, as boas conversas e a paciência de sempre.

À **Dra. Silvia Barbosa Ermelinda**, do Instituto Rene Rachou, pela atenção e ajuda na realização do estudo da fonte alimentar.

À **Profa. Dra. Antonia Claudia Jácome da Câmara** da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela amizade, incentivo, apoio e conselhos. Obrigada por ter me apresentado a esse mundo maravilhoso da pesquisa, por ter me proporcionado essa formação acadêmica e por continuar colaborando com o meu crescimento profissional.

À **Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu** e ao **Dr. João Luís Reis Cunha** pela atenção e ajuda imprescindível nas análises dos sequenciamentos.

A **Secretaria Estadual de Saúde Pública do Rio Grande do Norte**, especialmente a **Lúcia Maria Abrantes Aguiar**, por ter cedido os dados entomológicos para este trabalho e ser sempre tão atenciosa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Parasitologia (UFMG)**, pela oportunidade.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia (UFMG)**, pelos ensinamentos ao longo destes quatro anos.

À **Profa. Dra. Grasielle Caldas** e ao **Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira**, pelas contribuições dadas ao meu trabalho na banca de qualificação.

Ao grande amigo **Carlos Ramon do Nascimento Brito**, por ser sempre tão presente e atencioso desde a seleção até o seu último dia na UFMG. Obrigada pela força desde o momento da inscrição no doutorado, pela parceria, atenção, amizade, irmandade, companheirismo, cumplicidade, confiança pela ajuda nas apresentações, por ter lido a qualificação e por todo suporte emocional. Serei eternamente grata a Deus por ter colocado mais um irmão na minha vida.

À amiga **Daniela Ferreira Nunes**, por me convencer a cursar o doutorado no melhor Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela amizade, por todos os momentos vividos e pelas inúmeras vezes que teve que assistir minhas apresentações.

Àos amigos que a FIOCRUZ me proporcionou **Flávia, Luísa, Carla, Marta e Eduardo**, pela ajuda na realização de algumas etapas dos experimentos e principalmente pela amizade construída ao logo desses anos, repleta de risadas, descontrações, apoio e confiança.

Às amigas da UFMG (**Ana Paula, Elaine, Ivana, Jordanna, Thallyta e Daniella D'Ávila**) e amigos da turma do mamão (**Denise Barguil, Laura Maggi, Gabriel, Michelle, Vanessa, Thaíse, Camila e Luíza e Jordana**), pela amizade, companheirismo e conhecimentos compartilhados.

Às amigas, **Ana Lídia da Costa e Elis Paula Batista**, pela confecção de algumas figuras e por estar sempre à disposição para qualquer modificação.

Aos amigos do LaBioParChagas (UFRN), principalmente **Nathan Ravi, Raniery Santana e Pedro Ramon**, que sempre foram muito prestativos durante a execução dos experimentos. Obrigada pela amizade, coletas agradáveis, ajudas nos experimentos e pelo companheirismo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, **Sumara Aparecida e Sibebe Abreu**, pela atenção e disponibilidade.

Aos meus valiosos e eternos amigos, **Raquel Bandeira, Ilana França, Ana Lídia, Luara Musse, Danielle Garcia, Sara Neli, Kiev Martins, Pedro Ramon, Raniery Santana, João Correia, Thiago Espínola**, pelo carinho, amizade, incentivo e por compreenderem a minha ausência em vários momentos importante da vida de vocês. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

À adorável família que a Parasitologia me proporcionou. Obrigada **Denise Barguil, Samira Resende, Thais, Elis Paula** pelo convívio diário, por ótimos momentos compartilhados, por terem me acolhido, por se tornarem irmãs que irei levar para a vida, pelo apoio nas decisões e pelas sugestões durante os ensaios da apresentação da tese.

Ao Instituto René Rachou (IRR-FIOCRUZ/MINAS), pelo uso da Plataforma de Sequenciamento de DNA e a Elisangela e Renata, pelo apoio no sequenciamento do DNA.

À minha família (**Anibal Barbosa, Janice Noronha, Adriele Noronha, Raquel Bandeira, Hudson Paulinelli, Yasmin Paulinelli e Gabriel Paulinelli**), pelo amor incondicional e a compreensão em todos os momentos. Obrigada por existirem na minha vida e por sempre acreditarem em mim.

Ao amigo **Francisquinho** que sempre me guiou para o melhor caminho, que me acalmou em vários momentos nos quais eu precisava de sabedoria e serenidade para lidar. Obrigada pelo apoio, por ser tão presente e me ajudar em cada passo das minhas conquistas.

Por fim, a Deus, pela dádiva da vida e por ter me proporcionado esta experiência única e inesquecível, por me dar força e sabedoria todos os dias destes quatro anos.

RESUMO

A infestação dos ecótopos artificiais por triatomíneos, as ações de controle vetorial, a infecção natural por tripanossomatídeos e a distribuição territorial desses vetores foram avaliadas nos municípios do Rio Grande do Norte, Brasil, a partir dos dados disponibilizados pela Secretaria de Estado de Saúde Pública no período de 2005 a 2015 e no município de Caraúbas no período de 2010 a 2016. A fauna triatomínica silvestre, a infecção natural por tripanossomatídeos e a sua associação com a fonte de alimentação foram avaliadas na Estação Ecológica do Seridó, em Serra Negra do Norte. Além disso, a possibilidade da existência de híbridos naturais entre *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma petrocchiaie* também foi analisada morfológicamente e por sequenciamento do DNA mitocondrial, o citocromo b (*Cyt b*), e nuclear, o espaçador interno transcrito (ITS-1). Os dados mostraram que 67,7% (113/167) dos municípios realizaram a busca ativa e 110 registraram a ocorrência de triatomíneos nas unidades domiciliares (UDs). Os índices de colonização foram elevados ao logo dos anos pesquisados e, apesar disso, o número de UD's borrifadas foi inferior ao de positivas. Um total de 51.569 triatomíneos foi capturado, sendo *T. brasiliensis* (47,20%) e *Triatoma pseudomaculata* (40,22%) as espécies mais capturadas. A colonização intradomiciliar e peridomiciliar foi demonstrada pelas espécies *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus lutzi* e *Rhodnius nasutus*. A infecção natural por tripanossomatídeos foi detectada em 2,4% dos espécimes, sendo mais elevada em *T. brasiliensis* (3,2%). Em Caraúbas, as atividades de controle ocorreram de forma descontínua, e mesmo com a presença de ninfas, as UD's não foram borrifadas em 2013, 2014 e 2016. As espécies mais capturadas nos últimos anos foram *T. brasiliensis* (n = 244) e *T. pseudomaculata* (n = 315). Os dados primários revelaram a elevada infestação dos ecótopos peridomiciliares como galinheiro, curral e pilha de telhas, onde *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* apresentaram elevados percentuais de infecção pelo *T. cruzi*. A espécie *T. brasiliensis* foi a mais eclética, sendo o *Homo sapiens* a fonte alimentar frequentemente identificada no intradomicílio e peridomicílio, enquanto para o *T. pseudomaculata* a fonte mais detectada foi *Gallus gallus*. No ambiente silvestre, *T. brasiliensis* foi encontrado em afloramentos de rochas, juntamente com espécimes de *Triatoma sp.*, e *T. pseudomaculata* em troncos de árvores da espécie *Anadenanthera colubrina*. As fontes alimentares do *T. brasiliensis* foram os roedores *Thrichomys apereoides* (30%) e *Galea spixii* (30%). Nesse estudo nós registramos o primeiro encontro de *Psammolestes tertius* no estado, aumentando a área de distribuição geográfica dessa espécie. O *P. lutzi* apresentou o índice de infecção pelo *T. cruzi* mais elevado (64,8%),

e o genótipo identificado foi TcIII. O *Trypanosoma rangeli* foi identificado em apenas um espécime dessa espécie. *T. cruzi* II e III foram detectados na espécie *T. brasiliensis*. Na análise morfológica, *Triatoma* sp. apresentou semelhança com o *T. petrocchiae*. A similaridade genética entre essas duas espécies foi demonstrada utilizando o marcador ITS-1, as quais formaram um único clado. Entretanto, na análise das sequências do *Cytb*, o *Triatoma* sp., *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae* formaram clados distintos, sugerindo a existência de uma nova espécie, porém, é necessário a realização de outras análises para essa comprovação. O aumento dos índices de infestação e colonização dos triatomíneos, a presença desses vetores infectados e alimentados com sangue humano e de vários animais e, a circulação de animais silvestres infectados no ambiente antrópico, alerta para a possibilidade de transmissão do *T. cruzi* para o homem e animais domésticos. Os dados desse estudo reforçam que a VE e o controle vetorial nos municípios são imprescindíveis para evitar o contato de espécies como, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *P. lutzii* com a população e animais.

Palavras-chave: Triatominae. Infestação. Infecção natural. *Trypanosoma cruzi*. Vigilância entomológica. Diversidade genética.

ABSTRACT

The infestation of the artificial ecotopes by triatomines, the vector control actions, the natural infection by trypanosomatids and the territorial distribution of these vectors were evaluated in the municipalities of the State of Rio Grande do Norte, Brazil, based on the temporal analysis of the data provided by the State Secretariat of Public Health in the period from 2005 to 2015 and in the municipality of Caraúbas in the period from 2010 to 2016. The wild triatomine fauna, the natural infection by trypanosomatids and their association with the food source were evaluated at the Seridó Ecological Station, in Serra Negra do Norte. In addition, the possibility of natural hybrids between *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrocchiae*, was analyzed morphologically and by sequencing of mitochondrial DNA, cytochrome b (*Cyt b*), and nuclear, internal transcribed spacer (ITS-1). The data showed that 67,7% (113/167) of the municipalities performed the active search and 110 municipalities registered the occurrence of triatomines in the domiciliary units (DUs). Colonization rates were high during the surveyed years, and despite that, the number of DUs sprayed was lower than the positive ones. A total of 51.569 triatomines were captured, with *T. brasiliensis* (47,20%) and *T. pseudomaculata* (40,22%) being the most captured species. The indoor and outdoor colonization was demonstrated by the species *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus lutzi* and *Rhodnius nasutus*. The natural infection by trypanosomatids was detected in 2,4% of the specimens, being higher in *T. brasiliensis* (3,2%). In Caraúbas, the vector control activities occurred discontinuously, and even with the presence of nymphs, the DUs were not sprayed in 2013, 2014 and 2016. The most captured species in the last years were *T. brasiliensis* (n = 244) and *T. pseudomaculata* (n = 315). The primary data revealed the high infestation of outdoors ecotopes such as chicken coop, corral and pile of shingles, where *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* presented high percentages of *Trypanosoma cruzi* infection. *T. brasiliensis* was the most eclectic species, with *Homo sapiens* being the food source frequently identified in the intradomicile and peridomicile, while for *T. pseudomaculata* the food source was *Gallus gallus*. In the wild environment, *T. brasiliensis* was found in rock outcrops, along with specimens of *Triatoma* sp., and *T. pseudomaculata* on tree trunks of the species *Anadenanthera colubrina*. The food sources of *T. brasiliensis* were the rodents *Thrichomys apereoides* (30%) and *Galea spixii* (30%). In this study, we recorded the first encounter of *Psammolestes tertius* in the state, expanding the geographic distribution of this species. *P. lutzi* presented the highest *T. cruzi* infection rate (64,8%) and the genotype identified was TcIII. *Trypanosoma rangeli* was identified in only one specimen of this

species. *T. cruzi* II and III were detected in the species *T. brasiliensis*. The morphological analysis of *Triatoma* sp. presented similarity to *T. petrocchia*. The genetic similarity between both species was demonstrated using the ITS-1 marker, which formed a single clade. Nevertheless, in the analysis of *Cytb* sequences, *Triatoma* sp., *T. brasiliensis* and *T. petrocchia* formed distinct clades, suggesting the existence of a new species, however, further analysis are necessary for this confirmation. The increase of infestation and colonization rates of triatomines, the presence of these infected vectors fed with human blood and of several animals and the circulation of infected wild animals in the anthropic environment, point out the possibility of *T. cruzi* transmission to humans and domestic animals. The data of this study reinforce that ES and vector control in the municipalities are essential to avoid the contact of species, such as *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *P. lutz*, with the population and animals.

Keywords: Triatominae. Infestation. Natural infection. *Trypanosoma cruzi*. Entomological surveillance. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Distribuição dos municípios do estado do Rio Grande do Norte por mesorregiões e estratificação de risco da transmissão do <i>T. cruzi</i> de acordo com a Secretaria de Estado da Saúde Pública.....	37
FIGURA 2 -	Mapa do estado do Rio Grande do Norte destacando em cinza escuro o município de Caraúbas localizado na mesorregião Oeste.....	39
FIGURA 3 -	Captura de triatomíneos no ambiente domiciliar.....	41
FIGURA 4 -	Ecótopos peridomiciliares onde foram capturados triatomíneos no município de Caraúbas.....	42
FIGURA 5 -	Mapa do estado do Rio Grande do Norte destacando em cinza escuro o município de Serra Negra do Norte e a Estação Ecológica do Seridó.....	48
FIGURA 6 -	Captura de triatomíneos em afloramento de rochas na Estação Ecológica do Seridó no município de Serra Negra do Norte/RN...	49
FIGURA 7 -	Número de municípios do RN que realizaram a busca ativa nas UDs e registraram a presença de triatomíneos por estratificação de risco de transmissão do <i>T. cruzi</i> , no período de 2005 a 2015.....	54
FIGURA 8 -	Número de municípios do estado do RN que realizaram as atividades de busca ativa anualmente.....	55
FIGURA 9 -	Mapa do estado do Rio Grande do Norte destacando em cinza escuro os municípios com registro de triatomíneos infectados nas UDs no período de 2005 a 2015.....	59
FIGURA 10 -	Distribuição das espécies de triatomíneos capturadas, pelo menos uma vez, em ambientes artificiais nos municípios do estado do RN, no período de 2005 a 2015.....	59
FIGURA 11 -	Espécies de triatomíneos capturadas no ambiente silvestre (ESEC-Seridó).....	65
FIGURA 12 -	Distribuição das fontes alimentares das espécies <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. pseudomaculata</i> identificadas em diferentes ecótopos peridomiciliares do município de Caraúbas/RN.....	69
FIGURA 13 -	Fontes de alimentação identificadas nos triatomíneos infectados pelo <i>T. cruzi</i> encontrados no ambiente peridomiciliar do município de Caraúbas/RN.....	70

FIGURA 14 -	Fonte alimentar de <i>T. brasiliensis</i> capturados em afloramentos de rochas na ESEC-Seridó, no município de Serra Negra do Norte/RN.....	70
FIGURA 15 -	Fenograma construído a partir da matriz de presença e ausência de caracteres morfológicos utilizando o coeficiente de associação de Dice.....	74
FIGURA 16 -	Árvore de Máxima Verossimilhança obtida com base no gene <i>Cyt b</i> para mostrar a relação genética entre <i>Triatoma</i> sp., <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. petrocchiae</i> capturados no Rio Grande do Norte, juntamente com as amostras depositadas no <i>GeneBank</i> . Os números associados aos ramos referem-se aos valores de <i>bootstraps</i> para 1000 replicas.....	75
FIGURA 17 -	Árvore de Máxima Verossimilhança obtida com base no marcador ITS-1 para mostrar a relação genética entre <i>Triatoma</i> sp., <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. petrocchiae</i> capturados no Rio Grande do Norte, juntamente com as amostras depositadas no <i>GeneBank</i> . Os números associados aos ramos referem-se aos valores de <i>bootstraps</i> para 1000 replicas.....	76

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Localidades de Caraúbas/RN com busca ativa de triatomíneos realizada no período de 2010 a 2016.....	61
QUADRO 2 -	Identificação de fonte alimentar de triatomíneos alimentados em laboratório, identidade (Id) das sequências obtidas do conteúdo intestinal do vetor usando dois métodos diferentes de extração de DNA e código do <i>GeneBank</i>	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Características das cepas e clones de referência do <i>Trypanosoma cruzi</i> e dos marcadores genéticos.....	50
TABELA 2 -	Pesquisa da infestação (busca ativa) de triatomíneos nas UD's no Rio Grande do Norte, de acordo com a estratificação de risco, segundo dados fornecidos pela SESAP, no período de 2005 a 2015.....	55
TABELA 3 -	Avaliação da infestação, colonização, borrição das UD's e indicadores entomológicos.....	56
TABELA 4 -	Número anual e total de triatomíneos capturados, por espécies, nas unidades domiciliares dos municípios do estado do Rio Grande do Norte entre 2005 a 2015 (SESAP-RN).....	58
TABELA 5 -	Número de triatomíneos capturados por espécie e estágio evolutivo no intradomicílio e peridomicílio e índice de infecção global por tripanossomatídeos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de 2005 a 2015 (SESAP-RN).....	58
TABELA 6 -	Localidades investigadas, unidades domiciliares existentes, pesquisadas, positivas e borrições no município de Caraúbas/RN no período de 2010-2016.....	62
TABELA 7 -	Indicadores entomológicos observados no município de Caraúbas/RN no período de 2010-2011.....	62
TABELA 8 -	Espécies de triatomíneos por estágio, capturadas nos ecótopos artificiais do município de Caraúbas/RN, no período de 2010 a 2016.....	63
TABELA 9 -	Infestação dos ecótopos artificiais e infecção natural pelo <i>T. cruzi</i> em triatomíneos capturados em Caraúbas/RN, no período de 2010 a 2016.....	64
TABELA 10 -	Número de espécies de triatomíneos por ecótopo, estágio evolutivo e percentual de infecção natural pelo <i>T. cruzi</i>	66
TABELA 11 -	Fonte alimentar de <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. pseudomaculata</i> capturados nos ecótopos artificiais do município de Caraúbas/RN.....	68
TABELA 12	Número de espécimes e descrição dos caracteres morfológicos das espécies <i>T. brasiliensis</i> , <i>T. petrocchiai</i> e <i>Triatoma</i> sp.....	72

LISTA DE SIGLAS

μL	Microlitros
BHC	Hexaclorobenzeno
Cyt b	Citocromo b
DC	Doença de Chagas
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESEC-Seridó	Estação Ecológica do Seridó
FINSOCIAL	Fundo de Investimento Social
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
INCOSUL	Iniciativa do Cone Sul
ITS-1	Espaçador Interno Transcrito 1
km²	Quilometro quadrado
LabioParChagas/UFRN	Laboratório de Biologia de Parasitos e Doença de Chagas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte
M	Molar
mg	Microgramas
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
pb	Pares de bases
PCDCh	Programa de Controle da Doença de Chagas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PITs	Postos de Informação para triatomíneos
pmol	Picomol
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

SESAU/RN	Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte
SNM	Serviço Nacional de Malária
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
mM	Milimolar
RN	Rio Grande do Norte
U	Unidade
UDs	Unidades domiciliares
v/v	Volume/Volume
VE	Vigilância entomológica
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Aspectos gerais sobre a doença de Chagas.....	19
1.2 Os triatomíneos.....	21
1.3 Complexo <i>T. brasiliensis</i>	22
1.4 Programa de controle vetorial no Brasil.....	26
1.5 Doença de Chagas no Nordeste.....	30
1.6 Epidemiologia da doença de Chagas no Rio Grande do Norte.....	32
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Avaliar as atividades de vigilância entomológica (busca ativa e controle vetorial) no estado do Rio Grande do Norte.....	37
4.1.1 Área de estudo.....	37
4.1.2 Avaliação temporal da vigilância ativa e controle vetorial no estado do Rio Grande do Norte.....	38
4.2 Infestação de triatomíneos nas UDs do município de Caraúbas.....	39
4.2.1 Infestação por triatomíneos e atividades de vigilância entomológica no município de Caraúbas.....	40
4.2.2 Aspectos ecológicos dos triatomíneos.....	40
4.3 Identificação e pesquisa de tripanossomatídeos.....	42
4.3.1 Exame direto e dissecação dos triatomíneos.....	42
4.3.2 PCR do DNA do cinetoplasto (kDNA).....	43
4.3.3 PCR-Multiplex.....	44
4.4 Identificação da fonte alimentardos triatomíneos.....	45
4.4.1 Comparação dos métodos de extração do DNA.....	45
4.4.2 PCR do gene mitocondrial do RNA ribossomal 12S.....	46
4.4.3 Reação de sequenciamento.....	46
4.4.4 Análise das sequências.....	47
4.5 Aspectos ecológicos de espécies dos triatomíneos do ambiente silvestre.....	47
4.5.1 Área de estudo.....	47
4.6 Genotipagem do <i>T. cruzi</i>	49
4.7 Análise morfológica e taxonômica dos triatomíneos.....	50
4.7.1 Morfologia.....	50
4.7.2 Relações taxonômicas.....	51
4.7.3 Análise das sequências.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Capítulo 1: Avaliação dos dados referentes as capturas de triatomíneos realizadas no período de 2005 a 2015, disponibilizados pela SESAP/RN.....	54
5.1.1 Avaliação da vigilância entomológica(busca ativa e controle vetorial).....	54
5.1.2 Espécies de triatomíneos capturadas nas UDs e índice de infecção por tripanossomatídeos.....	57
5.1.3 Distribuição das espécies de triatomíneos nos municípios do RN.....	59
5.2 Capítulo 2: Avaliação dos dados referentes as capturas de triatomíneos realizadas no município de Caraúbas no período de 2010 a 2016.....	60

5.2.1 Vigilância entomológica, Infestação e infecção natural de triatomíneos no município de Caraúbas.....	60
5.3 Capítulo 3: Avaliação dos aspectos ecológicos dos triatomíneos encontrados nos ambientes antrópico e silvestre e genotipagem dos isolados do <i>T. cruzi</i>	64
5.3.1 Infestação dos ecótopos artificiais e infecção natural por tripanossomatídeos.....	64
5.3.2 Infestação dos ecótopos silvestres e infecção natural por tripanossomatídeos.....	64
5.3.3 Fonte alimentar.....	66
5.3.4 Genotipagem do <i>T. cruzi</i> isolado de triatomíneos capturados em ecótopos artificiais e silvestres.....	71
5.4 Capítulo 4: Análise morfológica e taxonômica de <i>Triatoma</i> sp.....	72
6 DISCUSSÃO.....	77
7 CONCLUSÕES.....	92
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXOS	
ANEXO 1 – Municípios classificados de acordo com a estratificação de risco de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	113
ANEXO 2 – Amostras de triatomíneos utilizadas para estudos morfológico e taxonômico no estado do Rio Grande do Norte.....	114
ANEXO 3 – Tabela 3 - Espécimes do Complexo <i>brasiliensis</i> (MONTEIRO et al., 2004) utilizados na análise das sequências dos triatomíneos deste estudo.....	115
ANEXO 4 – Número e percentual dos triatomíneos, por espécie e estágio, capturados no intradomicílio e peridomicílio nos municípios do estado do Rio Grande do Norte entre 2005-2015.....	116
ANEXO 5 – Número anual de ninfas de triatomíneos, por espécie, capturada no intradomicílio dos municípios do estado do Rio Grande do Norte entre 2005-2015..	117
ANEXO 6 – Número anual de ninfas de triatomíneos por espécie, capturadas no peridomicílio dos municípios no estado do Rio Grande do Norte entre 2005-2015...	118
ANEXO 7 – Índice de infecção pelo <i>T. cruzi</i> das espécies de triatomíneos capturadas nas unidades domiciliares no estado do Rio Grande do Norte.....	119
ANEXO 8 – Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2016).....	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida por tripanossomíase americana, é uma antropozoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que circula na natureza entre mamíferos silvestres e os seus vetores, os triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) (CHAGAS, 1909; DIAS, 2000). Essa endemia ocorre em 21 países da América Latina, onde há aproximadamente 5,8 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e mais de 70 milhões estão em áreas de risco (WHO, 2015).

Até a década de 1950, a DC era considerada basicamente uma endemia de áreas rurais, que acometia indivíduos pobres que viviam em habitações de baixa qualidade, propícias para proliferação dos vetores (BRASIL-MS, 1996) e estava diretamente relacionada com as economias de subsistência e populações marginalizadas (HOTEZ et al., 2008). Aos poucos, a doença foi se urbanizando em função do deslocamento das pessoas para as áreas urbanas, o que também contribuiu para a transmissão via transfusional (BRASIL-MS, 1996).

A DC, que antes ocorria somente no continente americano em virtude da distribuição das espécies de triatomíneos (WHO, 2015), expandiu-se para escala global com o aumento de movimentos migratórios de indivíduos da América Latina para países não endêmicos por mecanismos de transmissão transfusional e vertical (GURTLER & YADON, 2015). Desde então, casos da doença são detectados no Canadá, em vários países da Europa, Ásia e em países ocidentais do Pacífico (SCHMUNIS, 2007; COURA & DIAS, 2009; SCHMUNIS & YADON, 2010; COURA, VIÑAS & JUNQUEIRA, 2014; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015). Contudo, atualmente, o maior número de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* encontra-se em quatro países da América do Sul: Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186) (WHO, 2015).

Na América Latina, a principal forma de transmissão do parasito aos seres humanos é a vetorial, que ocorre a partir do contato das dejeções de triatomíneos contendo formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* com a pele lesionada ou mucosa íntegra, responsável por mais de 80% dos casos de infecção (DIAS & SCHOFIELD, 1999). Outros mecanismos de transmissão como a transfusão de sangue e a transmissão vertical também são importantes do ponto de vista epidemiológico. Além disso, o parasito também pode ser transmitido por via oral, acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados e transplantes de órgãos de doadores infectados (BRENER, 1987; DIAS & SCHOFIELD, 1999; COURA et al., 2015).

O principal vetor do *T. cruzi* na América do Sul é o *Triatoma infestans* (Klug, 1834), responsável pela maioria dos casos de DC humana (DIAS & SCHOFIELD, 1999). Essa espécie tem como centro geográfico de origem os vales andinos da Bolívia (DUJARDIN, SCHOFIELD & TIBAYRENC, 1998). Porém, focos silvestres já foram relatados em outras áreas da Bolívia (NOIREAU et al., 1997; NOIREAU et al., 2000; NOIREAU et al., 2005a; CORTEZ et al., 2006; ROJAS CORTEZ et al., 2007), na Argentina (ROJAS CORTEZ et al., 2007), no Paraguai (ROJAS CORTEZ et al., 2007) e no Chile (BACIGALUPO et al., 2010). O *T. infestans* se dispersou por vários países da América do Sul, aparentemente em associação com as migrações humanas (SCHOFIELD, 1988) e, na década de 1970, atingiu uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Peru, Paraguai e Uruguai (SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006).

Em 1991, foi proposta a primeira iniciativa internacional, a do Cone Sul (INCOSUL), composta por Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, na busca de consolidar o controle vetorial da transmissão domiciliar do *T. cruzi* pelo *T. infestans*. Essa iniciativa teve como objetivo a eliminação do *T. infestans* e da transmissão transfusional (DIAS & SCHOFIELD, 1998). De acordo com a certificação da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a INCOSUL, a transmissão do *T. cruzi* pelo *T. infestans* foi interrompida no Uruguai (1997), Chile (1999), Brasil (2006) (COURA & DIAS, 2009) e posteriormente, em cinco províncias da Argentina e no Paraguai Oriental (COURA et al., 2009). Estima-se que houve uma redução em mais de 80% da distribuição geográfica desse vetor (SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006). Com isso, as estratégias utilizadas na INCOSUL foram adotadas e adaptadas para as Iniciativas dos Países Andinos (1996), na América Central (1997) (WHO, 2002), e na Iniciativa Amazônica, em 2004 (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

No Brasil, a incidência da DC foi reduzida devido aos esforços bem sucedidos para a eliminação do *T. infestans*, ao controle de qualidade dos bancos de sangue e à melhoria das condições habitacionais em áreas endêmicas (WHO, 2008). No entanto, a DC continua sendo um problema de saúde pública em muitas áreas geográficas devido ao potencial de invasão e recolonização das residências por outras espécies de triatomíneos (GUHL, PINTO & AGUILERA, 2009). Além disso, sabe-se que as medidas de controle para essa endemia são limitadas em razão da diversidade de vetores; da variedade de reservatórios silvestres e domésticos do *T. cruzi* que são fontes de infecção para os triatomíneos; da ocorrência de casos humanos agudos assintomáticos não tratados que podem ser fontes de infecção; das condições econômicas, sociais e culturais que favorecem a transmissão no intradomicílio; da baixa

eficácia de medicamentos para o tratamento da infecção na fase crônica; e da ausência de vacina. Portanto, a principal medida de controle está focada na prevenção da transmissão vetorial por meio do uso de inseticidas nas unidades domiciliares (UDs), pela melhoria das condições das habitações humanas e a realização da vigilância entomológica (VE) (DIAS, 2000; NOIREAU et al., 2005b; SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006; SILVEIRA & DIAS, 2011).

1.2 Os triatomíneos

Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, composta por espécies potencialmente transmissoras do *T. cruzi* (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Atualmente 153 espécies de triatomíneos foram descritas, todas consideradas potenciais vetores do *T. cruzi*, agrupadas em 18 gêneros (ALEVI et al., 2016; MENDONÇA et al., 2016; ROSA et al., 2017; OLIVEIRA & ALEVI, 2017). Esses vetores estão distribuídos desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).

No Brasil, 65 espécies já foram relatadas, as quais estão distribuídas dentro de dez gêneros: *Alberprosenia* (Martínez & Carcavallo, 1977), *Belminus* (Stål, 1859), *Cavernicola* (Barber, 1937), *Eratyrus* (Stål, 1859), *Microtriatoma* (Lent, 1951), *Panstrongylus* (Berg, 1879), *Parabelminus* (Lent, 1943), *Psammolestes* (Bergroth, 1911), *Rhodnius* (Stål, 1859) e *Triatoma* (Laporte, 1832) (OLIVEIRA et al., 2016). A maioria ocorre apenas no ambiente silvestre e não apresenta importância na transmissão do *T. cruzi* para os humanos, como o *Cavernicola lenti* (Barrett & Arias, 1985), *Cavernicola pilosa* (Barber, 1937) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg, 1985) (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO et al., 2003).

A capacidade vetorial dos triatomíneos está relacionada ao grau de associação com os seres humanos. Cerca de dez espécies apresentam importância epidemiológica por serem capazes de colonizar o domicílio, onde aproximadamente 80% das infecções pelo *T. cruzi* ocorrem (GALVÃO et al., 2003; SCHOFIELD & GALVÃO, 2009) e mais de 20 são consideradas vetores secundários, as quais invadem o intradomicílio a partir de ecótopos peridomiciliares infestados (VALLEJO, GUHL & SCHAUB, 2009). No Brasil, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Triatoma sordida* (Stal, 1859), *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964) e *Rhodnius nasutus* (Stal, 1859) são vetores que muitas vezes invadem e colonizam as habitações humanas (DIAS, 2007).

Em relação ao ciclo de transmissão do *T. cruzi* no intradomicílio, ocorre a partir da interação entre o homem e o vetor, como consequência de modificações sociais e ecológicas provocadas pelos seres humanos, permitindo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos (DIAS, 1992). Sabe-se que a adaptação dos triatomíneos ao domicílio é um dos fatores determinantes para o estabelecimento da infecção humana. No peridomicílio, a transmissão ocorre por meio da interação entre espécies de triatomíneos silvestres, que são atraídas às residências pela luz em busca de alimento, e animais domésticos que atuam como reservatórios do parasito. Esse ambiente é muito importante do ponto de vista epidemiológico, pois pode atuar como elo entre os ambientes domiciliar e silvestre (DIAS, 2000). Além disso, alguns animais reservatórios, devido aos seus hábitos sinantrópicos, também apresentam um papel importante na transmissão do *T. cruzi* ao homem, interligando ambos os ambientes em um único ciclo epidemiológico (FERNANDES et al., 1989). Já no ambiente silvestre, o parasito circula entre os triatomíneos e muitas espécies de mamíferos em ecótopos naturais (DIAS, 1992).

Mesmo com a interrupção da transmissão do *T. cruzi* pelo *T. infestans*, é necessário que estudos ecológicos e de distribuição geográfica das espécies nativas de triatomíneos sejam realizados para o desenvolvimento das estratégias de ação de controle e vigilância entomológica (SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006; ABAD-FRANCH et al., 2013). A identificação da fonte de alimentação de triatomíneos contribui para o conhecimento dos hábitos alimentares desses vetores nos ecótopos naturais e artificiais (FREITAS et al., 2005; BOSSENO et al., 2006; CARANHA et al., 2006), o que é essencial para a compreensão da interação vetor-hospedeiro nos ciclos de transmissão do *T. cruzi* (BRENIÈRE et al., 2004). Várias ferramentas já foram utilizadas para determinar o hábito alimentar desses vetores, como a reação de precipitina (SIQUEIRA, 1960), o teste de fixação do complemento com base na detecção de anticorpos dos hospedeiros (STAAK et al., 1981), ELISA (CHOW, WIRTZ & SCOTT, 1993), PCR multiplex (MOTA et al., 2007), Q-PCR (IBÁÑEZ-CERVANTES, et al., 2013), sequenciamento dos genes citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (*Cytb*), clonagem e sequenciamento de produtos de PCR (BOSSENO et al., 2009).

1.3 Complexo *T. brasiliensis*

T. brasiliensis é o principal vetor do *T. cruzi* no semiárido da região Nordeste do Brasil. Essa espécie apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em 12 estados brasileiros: Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco,

Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (SILVEIRA, FEITOSA & BORGES, 1984; COSTA et al., 1998, 2003a; ALMEIDA et al., 2009; COSTA et al., 2014). *T. brasiliensis* pode ser encontrado colonizando diferentes ecótopos naturais e artificiais (SILVEIRA & VINHAES, 1999; COSTA, PETERSON & BEARD, 2002).

A espécie *T. brasiliensis* apresenta grande variação cromática. Baseado nisso, Lucena (1970) propôs a formação do complexo *brasiliensis* como um arranjo sistemático, composto pelas subespécies *Triatoma brasiliensis melanica* (Neiva & Lent, 1941) e *Triatoma brasiliensis macromelasoma* (Galvão, 1955), e pelas espécies *T. brasiliensis*, *Triatoma petrocchiae* (Pinto & Barreto, 1925), *Triatoma pessoai* (Sherlock & Serafim, 1967), *Triatoma lenti* (Sherlock & Serafim, 1967) e *Triatoma bahiensis* (Sherlock & Serafim, 1967).

Costa, Argolo & Felix (2006) elevaram a subespécie *T. b. melanica* ao status de espécie, por meio de parâmetros morfológicos, biológicos, ecológicos, enzimáticos, moleculares e cruzamentos experimentais, sendo a partir daí denominada de *T. melanica*. Em 2007, foi descrita uma nova espécie no município de Juazeiro no estado da Bahia, o *Triatoma juazeirensis*, por Costa e Felix (2007). Um estudo filogenético utilizando os genes mitocondriais *Cyt b* e 16S sugeriu que *Triatoma sherlocki* (Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002) deveria fazer parte do complexo *brasiliensis* (MENDONÇA et al., 2009). Então, Costa et al. (2013) propuseram que esse complexo deveria ser constituído por *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. melanica*, *T. juazeirensis* e *T. sherlocki*, excluindo o *T. petrocchiae*.

As espécies do complexo *T. brasiliensis* agrupadas por Costa et al. (2013) já haviam sido incluídas por Schofield & Galvão (2009) no complexo *Infestans* e subcomplexo *brasiliensis*: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *Triatoma melanocephala* (Neiva & Pinto, 1923), *T. petrocchiae*, *T. sherlocki*, *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926) e *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), usando parâmetros moleculares, morfológicos e geográficos. Entretanto, um estudo de descrição do cariótipo propôs que *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* fossem excluídas deste subcomplexo (ALEVI et al., 2012). A partir de uma reconstrução genética, na qual as espécies *T. lenti* e *T. petrocchiae* não foram incluídas, foi sugerido que o subcomplexo *brasiliensis* fosse formado por *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki* (MENDONÇA et al., 2009; GARDIM et al., 2014). No entanto, análises citogenéticas sugeriram que *T. lenti* poderia compor o subcomplexo *brasiliensis*, porém, seriam necessárias análises moleculares e filogenéticas para confirmação. Essa espécie juntamente com o *T. bahiensis* foram inseridas no complexo de espécies *T. brasiliensis* por Mendonça et al. (2016), a partir de estudos

multidisciplinares, e mais recentemente, informações filogenéticas e morfométricas também incluíram o *T. petrocchiaie* nesse grupo (OLIVEIRA et al., 2017).

O complexo *T. brasiliensis* é considerado um grupo monofilético que agrupa duas subespécies (*T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma*) e seis espécies (*T. melanica*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti*, *T. bahiensis*, *T. petrocchiaie*) (COSTA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Esse grupo foi formado baseado em parâmetros morfológicos (COSTA et al., 1997a, 2013), biológicos (COSTA & MARCHON-SILVA, 1998), ecológicos (COSTA et al., 1998), genéticos (PANZERA et al., 2000), biogeográficos (COSTA et al., 2014), cruzamentos experimentais (COSTA et al., 2003b; CORREIA et al., 2013) e análises moleculares (COSTA et al., 1997b; MONTEIRO et al., 2004; MENDONÇA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2016). Apesar de agrupadas por apresentar tais semelhanças, essas espécies apresentam particularidades diferentes no que diz respeito à importância epidemiológica, traços de história natural, exigências ecológicas e habilidade de dispersão (COSTA et al., 1998; SILVEIRA & VINHAES, 1999; COSTA, PETERSON & DUJARDIN, 2009; COSTA et al., 2003a; BORGES-PEREIRA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009, 2012; COSTA et al., 2014), além de variações cromáticas e diferenças nas proporções e dimensões corporais e na estrutura da genitália (LENT & WYGODZINSKY, 1979; COSTA et al., 1997a).

O *T. b. brasiliensis* é o vetor mais importante na transmissão do *T. cruzi* nos estados do Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí e Rio Grande do Norte (SILVEIRA & VINHAES, 1999; COSTA et al., 2003a; BORGES-PEREIRA et al., 2008) e o membro mais estudado do complexo devido à sua capacidade de colonizar domicílios (COSTA et al., 2003a), onde é encontrado com elevados índices de infecção (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2003a; BARBOSA-SILVA, 2013). No seu habitat natural pode ser encontrado em afloramento de rochas e cactos (*Pilosocereus gounellei*) (COSTA et al., 1998, 2003a; VALENÇA-BARBOSA et al., 2014).

O *T. b. macromelasoma* apresenta distribuição geográfica restrita, ocorrendo somente no estado de Pernambuco. Essa subespécie é predominante no peridomicílio, porém, pode ser encontrada infestando o intradomicílio. No ambiente silvestre *T. b. macromelasoma* é encontrado geralmente em pedras (COSTA et al., 1998, 2003a).

A espécie *T. melanica* é encontrada somente em algumas áreas dos estados da Bahia e Minas Gerais, dentro do bioma de cerrado (COSTA et al., 2014). Trata-se de uma espécie predominantemente silvestre, que eventualmente pode invadir o domicílio, principalmente durante os períodos mais secos (COSTA et al., 2003b).

O *T. juazeirensis* apresenta distribuição geográfica restrita, tendo registro somente no estado da Bahia, onde eventualmente coloniza o intradomicílio. Porém, essa espécie é facilmente encontrada no ambiente silvestre e no peridomicílio (COSTA et al., 1998, 2003a).

O *T. sherlocki* é o membro mais diferente do complexo *brasiliensis* em termos morfológico e genético (LENT & WYGODZINSKY, 1979; COSTA & FELIX, 2007; PAPA et al., 2002; COSTA, ARGOLO & FELIX, 2006; ALMEIDA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2009; COSTA et al., 2013). Trata-se de um membro atípico, que apresenta asas mais curtas, cor mais avermelhada, incapacidade para o voo e pernas mais longas (PAPA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2012; COSTA et al., 2013). É uma espécie silvestre que pode infestar o domicílio em áreas restritas do estado da Bahia (PAPA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012).

T. lenti e *T. bahiensis* foram descritos como formas melânicas do *T. brasiliensis* no estado da Bahia por Sherlock & Serafim (1972). Essas espécies foram diferenciadas com base no tamanho e coloração do conexivo. A descrição do *T. bahiensis* foi baseada em número incerto de espécimes capturados na cidade de Seabra, enquanto que o *T. lenti* foi capturado no intradomicílio das cidades de Brotas de Macaúbas, Ipupiara e Macaúbas. Na década de 70, o *T. bahiensis* foi determinado como uma variedade do *T. pessoai* e posteriormente considerado sinônimo do *T. lenti* (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Mendonça et al. (2016), por meio de análises morfológicas e morfométricas, sequenciamento do DNA mitocondrial, cruzamentos experimentais, citogenética e traços fenotípicos qualitativos, revalidaram o *T. bahiensis* como espécie. Estes autores também incluíram o *T. bahiensis* e o *T. lenti* no complexo *T. brasiliensis* a partir de análises filogenéticas.

T. petrocchia é uma espécie de triatomíneo silvestre limitada apenas à região Nordeste do Brasil e registrada nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO et al., 2003; CARANHA et al., 2011). Essa espécie tem sido encontrada somente em habitats xéricos e, às vezes, em tocas de roedores como *Kerodon rupestris* (Wied, 1820). Esse triatomíneo é similar ao *T. brasiliensis* em relação aos caracteres morfológicos, diferindo em relação ao primeiro segmento da antena que é menor, apresenta rostro praticamente glabro e fosseta esponjosa ausente nos machos e fêmeas (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Em relação aos padrões cromáticos, esta espécie é a mais similar ao *T. brasiliensis*. Há registros de que ambas as espécies ocorrem em simpatria no estado do RN (MONTEIRO, COSTA & SOLÉ-CAVA, 1998).

1.4 Programa de controle vetorial no Brasil

As primeiras medidas profiláticas para o controle dos triatomíneos no Brasil ocorreram na década de 1920, mas os resultados não foram satisfatórios. Essas medidas consistiam no aquecimento das paredes das habitações infestadas por *P. megistus* com fogo de lança chamas militar ou aplicação de substâncias como querosene e soda cáustica (DIAS et al., 2002).

Na década de 1940, o combate ao inseto vetor já era considerado a principal forma de controle da transmissão do *T. cruzi* ao homem (DIAS & SCHOFIELD, 1999). Nessa década, o controle vetorial ocorria por meio de métodos químicos, tentativas de melhoria da moradia e da educação sanitária, em experimentos realizados por Emmanuel Dias e José Pellegrino em Bambuí e no Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais. Além disso, estudos importantes também foram realizados em São Paulo por Pedreira de Freitas, os quais demonstraram a viabilidade do controle sobre vetores domiciliados, com a consequente interrupção da transmissão do *T. cruzi* para novas gerações de indivíduos susceptíveis (DIAS, 1957; DIAS & COURA, 1997; DIAS & SCHOFIELD, 1999).

O surgimento dos inseticidas sintéticos trouxe novas perspectivas para o controle vetorial (DIAS et al., 2002). Os organoclorados foram os primeiros inseticidas utilizados no controle de triatomíneos no Brasil (PINCHIN, OLIVEIRA FILHO & PEREIRA, 1980). Em 1942 foram realizados os primeiros ensaios biológicos com Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). LENT & OLIVEIRA (1944) demonstraram que a ação tóxica do DDT se processava mais rapidamente no estágio adulto do inseto. Por outro lado, esse produto não tinha ação ovicida, a sua penetração no tegumento das ninfas ocorria de forma lenta e a sua ação protetora em relação à reinfestação das UD's ocorria somente por um período de três a quatro meses. DIAS & PELLEGRINO (1948), em parceria com o Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu), realizaram ensaios de suscetibilidade de triatomíneos ao DDT borrifado em diferentes substratos e concentrações, avaliando o efeito residual do produto.

O hexaclorobenzeno (BHC) também foi testado no controle químico de triatomíneos no Brasil. Em condições de laboratório, verificou-se a ação tóxica do BHC em *Rhodnius prolixus* expostos a este produto, sendo observada uma intensa mortalidade dos exemplares. Contudo, o tempo de ação residual desse inseticida não foi satisfatório (BUSVINE & BARNES, 1947). Em Bambuí, Dias e Pellegrino (1948) comprovaram em experimento de campo a ação residual do BHC por até cinco meses após o tratamento, quando aplicado na dose de 1,0g de ingrediente ativo/m², em no mínimo dois ciclos de borrifações intervalados por 30-60 dias, preservando assim o domicílio de infestações por triatomíneos.

Em 1950 foi realizada a primeira grande campanha de controle de triatomíneos utilizando o BHC, conduzida por Emmanuel Dias juntamente com o Serviço Nacional de Malária (SNM). Em 1954, o SNM testou o dieldrin com a tentativa de substituir o BHC, porém, a sua utilização foi inviável devido ao alto custo e a ocorrência de intoxicações dos aplicadores e animais domésticos (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1956). Outros inseticidas testados no Brasil foram os carbamatos em 1959 (SHENONE et al., 1972), o bendiocarb, que já foi recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o controle de triatomíneos (PINCHIN, FANARA & OLIVEIRA FILHO, 1984), o malathion (SHERLOCK & MUNIZ, 1975; SHERLOCK, MUNIZ & GUITTON, 1976), outros organofosforados, entre outros (FOX, BAYONA & OROZCO, 1966).

O controle da transmissão vetorial do *T. cruzi* no Brasil foi institucionalizado em 1950 pelo SNM, porém a sistematização e estruturação em forma de programa de alcance nacional ocorreram somente a partir de 1975 pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) (SILVEIRA, 1999). A SUCAM, criada em 1967, internalizou as funções do DNERu e passou a ser responsável pelo planejamento e execução das ações de controle da doença. Em 1991, essas responsabilidades de executar tais funções foi repassada para a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (DIAS, 2002).

O Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) nacional seguiu o modelo clássico das campanhas, sobretudo o de erradicação da malária (SILVEIRA & DIAS, 2011). Esse modelo era composto por três fases operacionais: fase preparatória, de ataque e VE (BRASIL-MS, 1980; DIAS et al., 2002; MONCAYO & SILVEIRA, 2009; SILVEIRA & DIAS, 2011). A fase preparatória incluía: o reconhecimento geográfico, que consistia no mapeamento de localidades e UDs; o cadastramento da população e caracterização física das UDs; e o levantamento triatomínico, realizado por meio de busca ativa, que correspondia à linha de base entomológica utilizada para orientar as ações de controle com inseticidas. Na fase de ataque era realizado o combate químico extensivo e intensivo dos vetores, inicialmente em todas as UDs de todas as localidades positivas para a presença de triatomíneos e, posteriormente, somente nas infestadas (com um intervalo máximo de até seis meses). A fase de VE era instalada quando, na avaliação da fase de ataque, ficavam demonstradas a focalização da infestação, a garantia de cobertura integral da área avaliada e a regularidade das ações desenvolvidas. Essa fase era realizada por meio da VE transversal e complementada pela vigilância longitudinal, exercida pela população por meio de Postos de Informação para Triatomíneos (PITs) instalados nas localidades consideradas de risco de reinfestação (SILVEIRA & DIAS, 2011).

Até 1970, somente o estado de São Paulo realizava as ações de controle de forma regular, em paralelo com trabalhos de investigação em Bambuí, Minas Gerais (DIAS, 1957; VINHAES & DIAS, 2000). No período de 1979-1985, com a priorização do PCDCh, as informações sobre a prevalência da infecção e distribuição dos vetores foram atualizadas a partir de inquéritos sorológicos e entomológicos que foram promovidos no país. Com base nas informações atualizadas, as áreas endêmicas foram desenhadas e as ações de controle foram priorizadas onde havia os maiores riscos (DIAS et al., 2002).

Na década de 1980, 36% do território brasileiro era considerado área de risco de transmissão vetorial, no qual estavam inseridos 2.493 municípios distribuídos nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe e Tocantins (MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Desses, 711 municípios de 11 estados eram positivos para o *T. infestans*. Apesar da ocorrência de mais de 20 espécies de triatomíneos no ambiente domiciliar, apenas o *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *P. megistus* participavam diretamente da transmissão domiciliar do *T. cruzi* (VINHAES & DIAS, 2000).

Em 1983, o controle vetorial foi exercido em caráter pleno, atingindo a cobertura integral da área endêmica do país. Isso foi possível devido à criação do Fundo de Investimento Social (FINSOCIAL), imposto de caráter social, cujos recursos foram destinados para atender as necessidades do PCDCh (LIMA, 1983). O PCDCh manteve as atividades de controle de forma regular, com cobertura próxima à integral durante o período de 1984-1986. A partir de 1986, o andamento do programa e, conseqüentemente, as suas atividades foram prejudicadas em virtude do surgimento de epidemias de Dengue nos grandes centros urbanos, sendo a borrifação mantida somente em algumas áreas do Brasil (NOGUEIRA et al., 1999; SCHATZMAYR, 2000; BARBOSA DA SILVA et al., 2002; SILVEIRA & DIAS, 2011). Porém, o desempenho do programa não foi afetado, pois na maior parte da área endêmica já havia sido realizada a fase de ataque ao vetor (SILVEIRA & DIAS, 2011). Ainda nesse período, comprovou-se a eficiente ação triatomicida de vários piretróides, que passaram a ser utilizados no PCDCh (DIOTAIUTI et al., 1994; DIAS, 2002).

Este processo de controle vetorial, que ocorreu de forma integrada, resultou na Certificação da Interrupção da Transmissão da Doença de Chagas pelo principal vetor domiciliado (*T. infestans*), concedida pela OPAS/OMS ao Brasil em 2006, com a INCONSUL (DIAS, 2007; SILVEIRA & DIAS, 2011; BRASIL-MS, 2014). Em 2007, focos residuais dessa espécie foram encontrados na Bahia e no Rio Grande do Sul (cerca de 200

exemplares capturados) (SILVEIRA & DIAS, 2011), onde são observados até hoje (COURA, 2015).

Apesar de o controle ter reduzido a colonização domiciliar, as espécies nativas ainda se mantêm com ampla dispersão e populações domiciliadas (SILVEIRA & DIAS, 2011; SILVEIRA, SILVA & PRATA, 2011). As espécies *P. megistus*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* são ubíquas e podem ser encontradas tanto em ecótopos naturais quanto artificiais (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010), apresentando maior importância epidemiológica no Brasil por terem participação relevante na transmissão domiciliar do *T. cruzi* (SILVEIRA, FEITOSA & BORGES, 1984; SILVEIRA, 2011). Atualmente, *P. megistus* é considerada a espécie nativa mais importante no Brasil devido à sua ampla distribuição geográfica, suscetibilidade ao *T. cruzi* e fácil adaptação ao ambiente domiciliar (COURA, 2015). Já o *T. sordida* apresenta ampla distribuição territorial e é frequentemente encontrado no peridomicílio, principalmente em galinheiros (SHERLOCK, 2000; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). O *T. brasiliensis* e o *T. pseudomaculata* são os principais vetores na região Nordeste, sendo o primeiro mais frequente no ambiente domiciliar (SILVEIRA, FEITOSA & BORGES, 1984; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). A ocorrência de espécies nativas, que podem reinfestar as habitações após a aplicação de inseticidas, é considerada um obstáculo para a consolidação do controle efetivo da DC (FORATTINI, 1980; DIOTAIUTI et al., 2000; SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006).

Em 1999, com a portaria nº 1.399 do Ministério da Saúde, as ações de controle das endemias foram descentralizadas, transferindo as responsabilidades, que anteriormente eram da FUNASA, para os estados e municípios (SCHMUNIS & DIAS, 2000; SILVEIRA, 2011). Assim, os programas de controle das endemias foram municipalizados e passaram a ser geridos pelas prefeituras municipais sob a coordenação das Diretorias de Ações Descentralizadas de Saúde (SILVEIRA, 2011). A descentralização das ações de vigilância e controle da DC representa até o momento um grande desafio, pois, dependendo da gestão municipal, poderá ocorrer uma redução da prioridade das ações, como também a perda de reconhecimento da importância da doença (DIAS et al., 2002).

O risco de transmissão vetorial do *T. cruzi* ainda existe no Brasil (SILVEIRA & DIAS, 2011) e está associado: (i) à persistência de focos residuais de *T. infestans* na Bahia e no Rio Grande do Sul; (ii) à existência de espécies autóctones potencialmente vetoras no país; (iii) à emergência de algumas espécies como *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) com risco de domiciliação; (iv) à transmissão em caráter endêmico na Região Amazônica; e (v) à ocorrência de surtos ou microepidemias de

transmissão oral do parasito (SILVEIRA, 2011; VINHAES, et al., 2014; DIAS et al., 2016). Nesse contexto, é necessário que a VE para a DC esteja implantada em todo o país, adotando as atividades de vigilância passiva (com participação da população) e ativa (realizada por equipes de entomologia dos municípios) (BRASIL-MS, 2014).

A partir de 2006, as prioridades relacionadas às atividades de vigilância e controle foram consideradas proporcionais ao risco de transmissão do *T. cruzi* nas áreas de atuação (DIAS et al., 2016). A estratificação das áreas (municípios) de risco foi feita com base em diferentes variáveis, não somente as entomológicas, para a definição das prioridades em relação às áreas de atuação. A continuidade das ações de controle e as mudanças ambientais, econômicas e sociais, determinaram a situação atual de risco de transmissão vetorial do *T. cruzi* em determinadas áreas no Brasil, as quais apresentam situações epidemiológicas peculiares e diferentes espécies de triatomíneos (SILVEIRA & DIAS, 2011).

Atualmente o país apresenta três cenários epidemiológicos relacionados à transmissão do *T. cruzi*: (i) a região extra-amazônica que compreende, além do Distrito Federal, os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe, onde atualmente o risco de transmissão do parasito persiste em função da presença de espécies nativas; (ii) a região amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Rondônia, Roraima e Pará, que era considerada indene para a DC, porém, sabe-se que, atualmente, a transmissão endêmica do *T. cruzi* é mantida por mecanismos extradomiciliares (transmissão oral, extradomiciliar e domiciliar sem colonização vetorial); (iii) e uma área de transição (estados do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins), na qual é observada a ocorrência dos dois cenários anteriores (SILVEIRA & DIAS, 2011). Assim, é fundamental que o controle vetorial ocorra de maneira eficaz em todas as áreas rurais endêmicas, contribuindo para a minimização, em médio prazo, das demais formas de transmissão do *T. cruzi* (DIAS, 2000; SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006; DIAS et al., 2008). Todavia, sustentar os níveis de controle da transmissão domiciliar do *T. cruzi* ainda é um grande desafio (SILVEIRA & MARTINS, 2014).

1.5 Doença de Chagas no Nordeste

O primeiro registro da DC na região Nordeste do Brasil foi em 1911, no Sul da Bahia, relatada por Carlos Chagas (A IMPRENSA, 1911). Posteriormente essa endemia foi detectada em outras áreas da Bahia, Pernambuco, Sergipe e Ceará, com relato de triatomíneos domiciliados (PIRAJÁ-DA-SILVA, 1913; LUTZ & MACHADO, 1915; LUCENA, 1952;

ALENCAR, 1987; DIAS & SCHOFIELD, 1998). No contexto epidemiológico da DC, esta região apresentou importância no primeiro inquérito nacional de prevalência e distribuição dos vetores, ocupando a segunda posição em número de infectados e índices de infestação por triatomíneos (CASTRO-FILHO & SILVEIRA, 1979). Em relação à importância epidemiológica dos vetores, as espécies *P. megistus* e *T. brasiliensis* tiveram maior participação na transmissão domiciliar da infecção chagásica (SILVEIRA, 2011). No segundo inquérito nacional, a região Nordeste apresentou o número mais elevado de triatomíneos capturados, correspondendo a 69,2%, sendo *T. brasiliensis* (43,12%) e *T. pseudomaculata* (37,47%) as espécies mais encontradas no ambiente domiciliar (SILVEIRA & VINHAES, 1998). Estas espécies, nativas do semiárido e com ampla distribuição territorial (PIRAJÁ-DASILVA, 1913; LUTZ & MACHADO, 1915; LUCENA, 1952; LUCENA, 1959; FORATTINI, 1980; ALENCAR, 1987; DIAS et al., 2000; GALVÃO et al., 2003; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012), são encontradas em todos os estados da região e capturadas em ecótopos artificiais, os quais reinvadem a partir do ambiente silvestre (CASTRO-FILHO & SILVEIRA, 1979; SILVEIRA & VINHAES, 1998; DIAS et al., 2000; COSTA et al., 2003a; SILVEIRA, 2011).

Estudos pioneiros revelaram a presença constante do *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* nos ambientes domiciliar e peridomiciliar nos estados da Paraíba (LUCENA & COSTA, 1954), Ceará (ALENCAR, 1965), Piauí (COURA et al., 1996) e Rio Grande do Norte (LUCENA, 1959; CASTRO-FILHO & SILVEIRA, 1979; DIAS et al., 2000). Na Paraíba, Lucena & Costa (1954) chamaram a atenção para a predominância do *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, com índices de infecção pelo *T. cruzi* de 17,1% e 2,8%, respectivamente, porém com baixa infestação domiciliar. No Piauí, o *T. brasiliensis* foi predominante nas UDs de determinadas áreas do estado (COURA et al., 1996). Essa espécie também foi predominante no Ceará, com infecção natural pelo *T. cruzi* de 15,4% (ALENCAR, 1965). Elevados índices de infecção também foram detectados em *T. pseudomaculata* (18%) e *T. brasiliensis* (15,3%) capturados em vários ambientes no município de Jaguaruana, no Ceará (SARQUIS et al., 2004). Neste estado, Diotaiuti et al. (2000) investigaram 227 UDs com o propósito de avaliar o processo de infestação e reinfestação pelo *T. brasiliensis* e encontraram 48% de casas infestadas. Após o tratamento com inseticidas piretróides, os resultados foram satisfatórios no controle das populações domésticas, porém com rápida reinfestação dos ecótopos peridomiciliares, sendo este fato atribuído à presença dessa espécie no ambiente silvestre.

Atualmente, a região mais importante para a DC no Brasil é a Nordeste, devido à ampla

distribuição geográfica de espécies nativas como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *R. nasutus* (DIAS, 2000; DIAS et al., 2008; LIMA et al., 2008). *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* continuam sendo as espécies mais capturadas em vários estados do Nordeste, com elevados índices de infecção. No Piauí, de 22.896 espécimes capturados, 65% eram *T. brasiliensis* e 28% eram *T. pseudomaculata* (GURGEL-GONÇALVES et al., 2010). Em Pernambuco, as espécies *T. brasiliensis* (810) e *T. pseudomaculata* (706) foram as mais capturadas em 185 municípios investigados, com índices de infecção natural pelo *T. cruzi* de 13,1% e 35,1%, respectivamente (SILVA et al., 2015). Em Morada Nova, no estado do Ceará, 730 exemplares foram capturados em ecótopos naturais e artificiais, e aproximadamente 90% eram *T. brasiliensis*, com índice de infecção natural de 11,6% (SARQUIS et al., 2012). Em nove municípios do Rio Grande do Norte, 66,4% dos 824 espécimes capturados em ecótopos artificiais e naturais foram *T. brasiliensis* e 18,2% *T. pseudomaculata*, ambos com elevados índices de infecção pelo *T. cruzi* nos diferentes ambientes (BARBOSA-SILVA, 2013).

De acordo com o último inquérito sorológico nacional realizado em crianças no período de 2001 a 2008, a incidência da infecção pelo *T. cruzi* foi de 0,1% (104/104.954). A possibilidade de transmissão vetorial foi atribuída a 0,01% (11/104.954) dos casos, cujas mães apresentaram sorologia não reativa para a infecção pelo *T. cruzi*. Dessas crianças, nove são da região Nordeste e uma mais especificamente, do município de Várzea no estado do Rio Grande do Norte (RN) (OSTERMAYER et al., 2011).

1.6 Epidemiologia da doença de Chagas no estado do Rio Grande do Norte

Antes da implantação das ações de controle vetorial, juntamente com a INCOSUL, o *T. infestans* era considerado o principal transmissor domiciliado do *T. cruzi* na maioria das regiões brasileiras. Na região Nordeste, esse vetor foi introduzido na década de 1950, onde se dispersou rapidamente (DIAS et al., 2000). Porém, em vários estados dessa região, como o RN, essa espécie nunca foi encontrada (SILVEIRA, FEITOSA & BORGES, 1984; SILVEIRA & VINHAES, 1999), sendo o *T. brasiliensis* o principal transmissor e a espécie predominante no ambiente antrópico desde 1959 (LUCENA, 1959).

No final da década de 1950, uma vasta área do RN ainda era considerada sem importância epidemiológica devido à ausência de triatomíneos e de indivíduos infectados no litoral e nas zonas salineiras. Por outro lado, nas demais áreas, as taxas de infestação por triatomíneos em condições de transmitir o parasito eram elevadas (Seridó, 75%; Chapada do Apodi, 100%; e Serrana, 100%) (LUCENA, 1959). No período de 1957 a 1962 foram realizados os primeiros estudos relacionados a infecção humana pelo *T. cruzi* no estado, sendo

relatada uma estimativa de 12,2% de soroprevalência em áreas onde mais de 60% dos espécimes de triatomíneos capturados eram *T. brasiliensis* (COURA et al. 1984; COSTA et al., 2003a).

O início do PCDCh no estado do RN ocorreu na década de 1970, com o DNERu. Em 1975, as ações de controle tiveram início na região do Seridó, localizada na mesorregião Central do estado, estendendo-se posteriormente à região serrana e expandindo-se, em seguida, para outros municípios. Todavia, o programa de combate ao vetor ocorreu de forma descontínua devido à falta de recursos (FUNASA, 1996), o que também ocorre atualmente.

Dados mais recentes mostraram uma estimativa de soroprevalência de 6,5% em municípios da mesorregião Oeste do estado do RN, considerada elevada quando comparada ao município de Caicó (3,3%), na mesorregião Central (BRITO et al., 2012). Os dados do último inquérito sorológico nacional indicam a ocorrência de transmissão vetorial no estado, uma vez que uma criança foi diagnosticada infectada com o *T. cruzi*, cuja mãe apresentava sorologia não reativa (OSTERMAYER et al., 2011). Além disso, triatomíneos com elevados índices de infecção natural pelo *T. cruzi* foram encontrados em ecótopos artificiais de vários municípios do estado (BARBOSA-SILVA, 2013), o que também pode sustentar essa hipótese.

Mesmo após a atuação do PCDCh, estudos nos municípios de Caicó, Caraúbas e Serra Negra do Norte, mostraram a infestação por *T. brasiliensis* e *P. lutzi* nos ecótopos artificiais e naturais com percentuais de infecção pelo *T. cruzi* correspondendo a 28,3% (28/99) e 7,5% (9/120), respectivamente (CÂMARA et al., 2010). Barbosa-Silva (2013) também encontraram elevados índices de infecção em triatomíneos capturados nos ambientes intradomiciliar (50%), peridomiciliar (20,1%) e silvestre (41,8%) em municípios das mesorregiões Central e Oeste do RN, sendo *P. lutzi* (78%) a espécie com o percentual de infecção mais elevado, seguida do *T. brasiliensis* (24,4%) e *T. pseudomaculata* (22,6%). Além de *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *P. lutzi*, também foi relatada a ocorrência do *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), *T. melanocephala*, *Panstrongylus diasi* (Pinto & Lent 1946), *P. megistus* e *R. nasutus*, sendo as duas primeiras espécies as mais frequentes em UD's (LUCENA, 1959; CASTRO-FILHO & SILVEIRA, 1979; COSTA et al., 2003a; SILVEIRA, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Após a descentralização do sistema de saúde brasileiro, as medidas de controle vetorial têm sido de responsabilidade dos governos municipais, que nem sempre alcançaram os resultados desejados devido às dificuldades operacionais e políticas e à falta de recursos financeiros (DIAS, 2000). Em áreas onde o sistema de vigilância é falho e a presença de espécies nativas é comum nos ambientes antrópicos e naturais, a interação parasito-vetor-reservatório-hospedeiro é mantida (XAVIER et al., 2014).

Do ponto de vista da infecção humana pelo *T. cruzi*, um estudo recente realizado em indivíduos da zona rural da mesorregião Oeste (1.950 indivíduos) e no município de Caicó (390) do estado RN demonstrou a estimativa de soroprevalência de 6,5% e 3,3%, respectivamente. Os resultados também mostraram que nenhum participante menor de 18 anos foi sororreativo, além do aumento progressivo da soropositividade em indivíduos com até 50 anos na mesorregião Oeste e 40 anos em Caicó (BRITO et al., 2012). Porém, apesar da tendência de queda nas taxas de prevalência e incidência da infecção, a possibilidade de transmissão vetorial não pode ser descartada. O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* em uma criança do município de Várzea (mesorregião Agreste), cuja mãe apresentou sorologia negativa, sustenta esta hipótese (OSTERMAYER et al., 2011).

Em vários municípios do RN, como Caraúbas, cuja soroprevalência em indivíduos adultos foi elevada, as espécies de triatomíneos *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* estão presentes colonizando os ambientes artificiais, muitas vezes apresentando elevados índices de infecção pelo *T. cruzi*, correspondendo respectivamente a 24,4% e 22,6% (BARBOSA-SILVA, 2013). Avaliar a distribuição geográfica dessas espécies de importância epidemiológica é fundamental para entender a dimensão espacial e o risco de transmissão do parasito (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). Estudos que consideram os componentes do sistema epidemiológico permitem a detecção precoce da infecção (ROMAÑA, 2007).

A compreensão dos aspectos epidemiológicos do ciclo de transmissão do *T. cruzi* é fundamental para o planejamento das ações de controle e monitoramento da infecção chagásica, podendo contribuir para a redução do contato dos vetores com os seres humanos. Além disso, o estudo sobre a ecologia e o comportamento dos vetores nos ambientes antrópicos e silvestres é fundamental para a compreensão do processo de domiciliação de cada espécie e dos ciclos de transmissão do parasito e a interação entre o habitat natural e os ecótopos artificiais. A identificação da fonte alimentar é uma forma de compreender a relação entre as espécies de triatomíneos e sua preferência alimentar permitirá detectar os hospedeiros naturais e seu papel na transmissão do *T. cruzi*. Estes estudos podem contribuir para o

planejamento e estabelecimento de novas estratégias de controle nos municípios do estado do RN.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial para a transmissão vetorial do *T. cruzi* no estado do Rio Grande do Norte e os principais aspectos ecológicos das espécies de triatomíneos e, determinar a relação taxonômica entre *T. brasiliensis* e *T. petrocchiaae*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as atividades de vigilância entomológica (busca ativa e controle vetorial), a distribuição, infestação e colonização das diferentes espécies de triatomíneos capturados nos ambientes artificiais e o índice de infecção natural por tripanossomatídeos nos municípios do estado do Rio Grande do Norte;
- ✓ Avaliar a infestação, infecção natural pelo *T. cruzi* e fonte de alimentação dos triatomíneos capturados em diferentes ecótopos dos ambientes silvestre e antrópico nos municípios de Serra Negra do Norte e Caraúbas/RN, respectivamente;
- ✓ Comparar os métodos de extração do DNA para a identificação da fonte alimentar das espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*;
- ✓ Determinar os genótipos de *T. cruzi* isolado dos triatomíneos capturados nos municípios de Caraúbas e Serra Negra do Norte/RN;
- ✓ Identificar por parâmetros morfológicos e moleculares das espécies de triatomíneos no ambiente silvestre e determinar sua relação com o *T. brasiliensis* e o *T. petrocchiaae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliar as atividades de vigilância entomológica (busca ativa e controle vetorial) no estado do Rio Grande do Norte

4.1.1 Área de estudo

O estado do RN está localizado na região Nordeste do Brasil, ocupando 3,14% do território do país e extensão territorial de 52.810,7km². Está politicamente dividido em 167 municípios, agrupados em quatro mesorregiões: Oeste, Central, Agreste e Leste (**Figura 1**). Sua população abrange 3.168.133 habitantes, 2.465.439 em áreas urbanas e 702.694 na zona rural (IBGE, 2010).

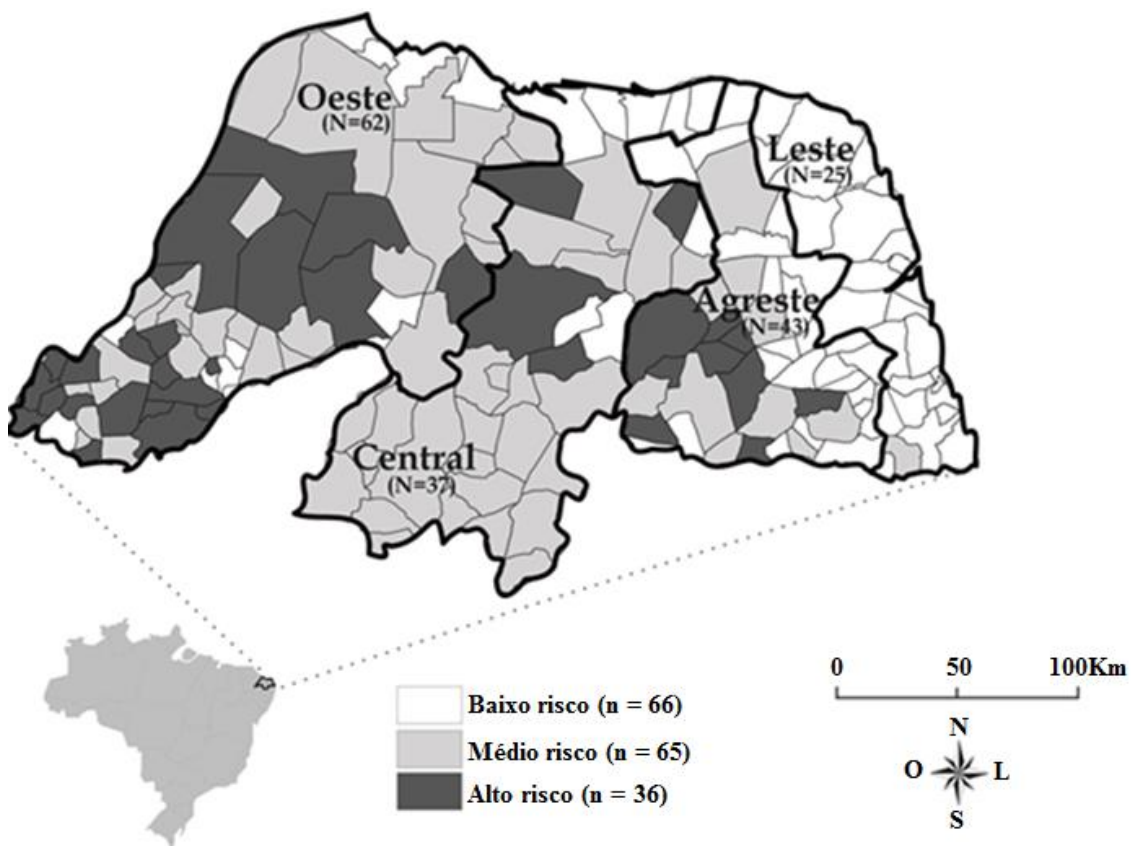


Figura 1 - Distribuição dos municípios do estado do Rio Grande do Norte por mesorregiões e estratificação de risco da transmissão do *T. cruzi* de acordo com a Secretaria de Estado da Saúde Pública.

Fonte: IBGE (2017) modificado pela autora.

Cerca de 90% do território do RN está inserido no semiárido, que abrange desde o sertão até o litoral. Essa área tem como vegetação predominante a caatinga hiperxerófila e

semiárido como clima, o qual ocorre de forma contínua nessa área, estendendo-se até o litoral setentrional, com temperatura média anual de 25,5°C, sendo a máxima de 31,1°C e a mínima de 21,1°C (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO RN, 2015). De acordo com a SESAP-RN, 36 (21,5%) municípios estão classificados como de alto risco para a transmissão do *T. cruzi*, 65 (39,5%) de médio risco e 66 (39%) de baixo risco (**Figura 1, Anexo 1**). A estratificação de risco associada à transmissão vetorial foi proposta como estratégia importante para orientação e sustentação das ações de controle no país e tem sido incorporada em diferentes perspectivas pelos programas de controle dos estados e municípios. Neste estudo, os fatores observados para avaliar a possibilidade de risco de transmissão vetorial foram os índices de infestação e de colonização, as espécies de triatomíneos presentes nas unidades domiciliares (autóctones ou alóctones) e a taxa de infecção pelo *T. cruzi* desses insetos, conforme Dias et al. (2016).

Para o estudo foram avaliados os dados referentes à captura de triatomíneos por busca ativa no período de 2005 a 2015, disponibilizado pela SESAP/RN. Nos municípios, os triatomíneos foram capturados nas unidades domiciliares (UDs) pelos agentes de endemias e encaminhados para as suas respectivas Unidades Regionais de Saúde Pública (URSAP), onde foram identificados e examinados para a detecção do *T. cruzi* por meio do exame direto das fezes dos insetos. Nos dados constavam informações como: captura por municípios; número de UD's existentes, investigadas, positivas, com ninfas no intradomicílio e borrifadas; espécie de triatomíneos; ambiente de captura (intradomicílio e peridomicílio); e infecção natural por tripanossomatídeos.

Do ponto de vista conceitual, UD é o conjunto composto pela habitação humana e os anexos no espaço próximo as casas. O intradomicílio corresponde à habitação (espaço interno e as paredes externas) e o peridomicílio é o espaço externo, próximo a casa, que inclui os anexos e outros possíveis abrigos para triatomíneos (galinheiro, curral, chiqueiro, pilhas de telhas e tijolos, etc).

4.1.2 Avaliação temporal da vigilância ativa e controle vetorial no estado do Rio Grande do Norte

Os dados referentes às capturas de triatomíneos nas UD's dos municípios do RN foram utilizados para:

- ✓ Determinação do número de municípios que realizaram a vigilância entomológica por ano;
- ✓ Determinação dos seguintes indicadores entomológicos (WHO, 1991):

-Índice de infestação intradomiciliar: Número de intradomicílios positivos \times 100/número de intradomicílios pesquisados;

-Índice de infestação peridomiciliar: Número de peridomicílios positivos \times 100/número de peridomicílios pesquisados;

-Índice de colonização intradomiciliar: Número de UDs com ninfas no intradomicílio \times 100/número de UDs com triatomíneos no intradomicílio;

-Índice de infecção natural: Número de triatomíneos infectados por tripanossomatídeos \times 100/número de triatomíneos examinados;

- ✓ Avaliação do número de UDs positivas que foram submetidas ao controle químico ao longo dos anos;
- ✓ Atualização das espécies de triatomíneos capturadas nos ecótopos artificiais;
- ✓ Determinação da distribuição geográfica das espécies de triatomíneos.

4.2 Infestação de triatomíneos nas UDs do município de Caraúbas

O município de Caraúbas está localizado na mesorregião Oeste do RN, com área de 1.132,860 km² e 260 localidades (**Figura 2**). A população local é constituída por 19.576 habitantes, dos quais 5.872 residem em áreas rurais (IBGE, 2016).

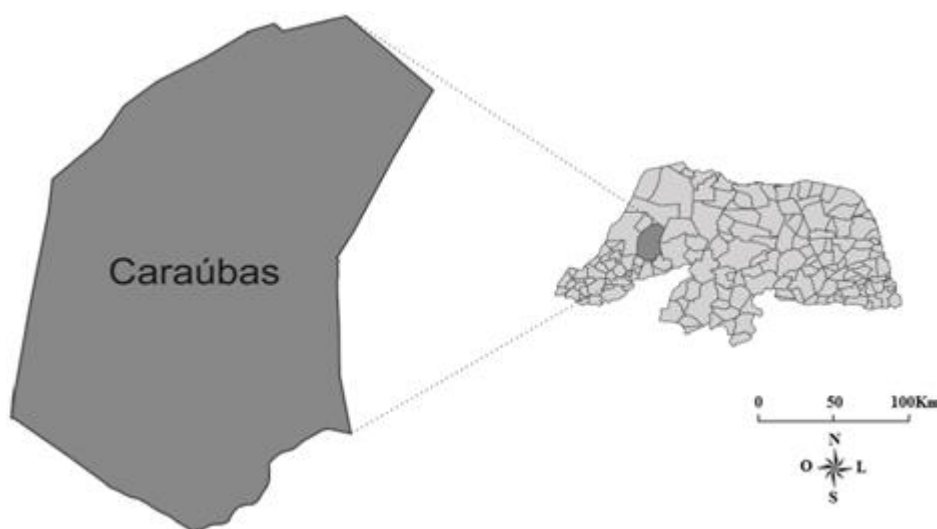


Figura 2 – Mapa do estado do Rio Grande do Norte destacando em cinza escuro o município de Caraúbas localizado na mesorregião Oeste.

Fonte: IBGE (2017) modificado pela autora.

O município de Caraúbas foi escolhido para o estudo pelas seguintes razões: **(1)** estar inserido numa área de elevada estimativa de soroprevalência para a infecção humana pelo *T. cruzi* (10,3%) (BRITO et al., 2012); **(2)** ser considerado um município de alto risco de

transmissão do parasito de acordo com o Ministério da Saúde; (3) apresentar elevados índices de infestação de ecótopos artificiais por *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*; e (4) por apresentar elevados índices de infecção natural pelo *T. cruzi* no intradomicílio e peridomicílio (BARBOSA-SILVA, 2013).

O estudo da situação ecoepidemiológica atual do município foi realizado em duas etapas: (1^a) avaliar a ocorrência de triatomíneos, a infestação das UD's e as atividades de controle a partir de dados secundários disponibilizados pela SESAP-RN; (2^a) avaliar os aspectos ecológicos dos triatomíneos: infestação dos ecótopos, infecção natural pelo *T. cruzi*, fonte de alimentação e relação entre ecótopo-infecção-fonte alimentar, a partir de uma pesquisa de campo.

4.2.1 Infestação por triatomíneos e atividades de vigilância entomológica no município de Caraúbas

Na primeira etapa do trabalho foi realizada uma análise temporal com os dados disponibilizados pela SESAP-RN, referentes às capturas de triatomíneos no período de 2010 a 2016 para avaliar as atividades de vigilância entomológica (busca ativa e controle químico) e verificar as espécies de triatomíneos e estádios presentes nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar. Os indicadores entomológicos (índice de infestação, índice de colonização intradomiciliar e peridomiciliar e índice de infecção natural pelo *T. cruzi*) também foram calculados conforme descritos no item 4.1.2 (WHO, 1991).

4.2.2 Aspectos ecológicos dos triatomíneos

Na segunda etapa, as capturas de triatomíneos foram realizadas pelo autor deste estudo, com a assistência de um agente de endemias do respectivo município, nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar das UD's no período de 2010 a 2016. As coletas foram realizadas no período diurno em localidades positivas, conforme os dados da vigilância entomológica. O tempo de permanência em cada UD foi em média de 40min/duas pessoas. No intradomicílio, as buscas foram realizadas em todos os cômodos e por trás dos móveis (**Figura 3**). Em relação ao peridomicílio, as buscas por triatomíneos ocorreram em galinheiros, currais, chiqueiros, pilhas de telhas e tijolos, palha seca da carnaúba e alguns anexos fechados como igrejas e escolas (**Figura 4**). Os triatomíneos foram capturados manualmente (sem uso de substâncias desalojantes e armadilhas) com auxílio de pinça e acondicionados em frascos de plásticos, devidamente etiquetados (com data, ambiente, ecótopo e município de origem). Todos os triatomíneos capturados foram encaminhados para

o Laboratório de Biologia de Parasitos e Doença de Chagas/ Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LaBioParChagas/UFRN), onde foram identificados de acordo com os parâmetros da chave de Lent & Wygodzinsky (1979). Em seguida, o conteúdo intestinal dos insetos foi analisado por exame direto (Item 4.3.1) e PCR do *kDNA* (Item 4.3.2) para detecção do *T. cruzi*. A reação da PCR multiplex (Item 4.3.3) foi realizada para o diagnóstico diferencial das espécies *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920). O conteúdo intestinal também foi utilizado para a identificação da fonte alimentar usando ensaios moleculares realizados no Laboratório de Referência de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas no Instituto Rene Rachou/FIOCRUZ/MINAS (LATEC/IRR/FIOCRUZ/MINAS).



Figura 3 – Captura de triatomíneos no ambiente domiciliar.
Fonte: Acervo próprio.



Figura 4 – Ecótopos peridomiciliares onde foram capturados triatomíneos no município de Caraubas. A: Pilha de telhas; B: Galinheiro; C: Curral; D: Espécime de *T. brasiliensis* capturado na parede do curral.

Fonte: Acervo próprio.

4.3 Identificação e pesquisa de tripanossomatídeos

4.3.1 Exame direto e dissecação dos triatomíneos

O diagnóstico parasitológico da infecção pelo *T. cruzi* foi realizado com o conteúdo intestinal dos triatomíneos por compressão abdominal. As fezes dos insetos foram diluídas em 5µL de solução salina a 0,9%, colocadas sobre lâmina e lamínula e observadas em microscópio óptico com aumento de 400× (DIAS et al., 2016). Após o exame direto, os triatomíneos foram colocados em solução *White* por 30min e lavados com solução salina a 0,9% (estéril) em ambiente estéril para serem dissecados. Cada inseto teve as cutículas do abdome removidas usando pinças e tesoura, o conteúdo intestinal retirado completamente e dividido em duas partes: (1ª) para o estudo de fonte alimentar, armazenada a -70°C em um tubo de 1,5mL; e a (2ª) foi colocada em um poço de placa com 24 poços contendo 500µL de solução salina estéril segundo Bronfen et al. (1989) para a pesquisa de tripanossomatídeos. O conteúdo intestinal foi macerado e aproximadamente 250µL da suspensão foram semeadas em tubo plástico estéril contendo os meios de cultura *Liver Infusion Tryptose-LIT* (CAMARGO, 1964) + McNeal Novy e Niccole (NNN) ou Ágar sangue para a xenocultura. Os tubos foram incubados a temperatura de 28°C e uma alíquota de cada amostra foi

examinada após 15, 30 e 60 dias ao microscópio óptico com aumento de 400×. Cerca de 200µL foram diluídos (v/v) em solução de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M, mantida 5-7 dias a temperatura ambiente e fervidas a 100°C por 15min (BRITTO et al., 1993) e posteriormente as amostras foram armazenadas a 4°C até o momento da extração do DNA. Nem todos os triatomíneos tiveram o conteúdo intestinal suficiente para o estudo da fonte alimentar, sendo priorizado a detecção do *T. cruzi*.

4.3.2 PCR do DNA do cinetoplasto (kDNA)

A PCR-kDNA foi realizada para avaliar a infecção dos triatomíneos a partir da detecção do DNA do cinetoplasto do *T. cruzi*. A extração do DNA foi realizada com 200µL de cada amostra (conteúdo intestinal) diluída em Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M em microtubo de 1,5mL acrescida de 100µL de fenol Tris pH 8,0 e 100µL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada lentamente por 2min e centrifugada a 6.000rpm (Microcentrífuga *Eppendorf* modelo 5418, *Hamburg, Germany*) durante 5min. O sobrenadante foi removido para um segundo microtubo (microtubo 2) e ao sedimento foram adicionados 200µL de água MiliQ estéril, homogeneizado lentamente por 2min e centrifugado a 6.000rpm durante 5min. O sobrenadante foi transferido para o microtubo 2 e o sedimento descartado. Na etapa seguinte, 300µL de clorofórmio foram adicionados ao sobrenadante, a mistura foi homogeneizada lentamente por 2 min e centrifugada por 5min a 6.000rpm. Aproximadamente 260µL do sobrenadante foi transferido para um terceiro microtubo contendo 100mM de acetato de sódio, 40µg de glicogênio (*Boehringer, Mannheim, Germany*) e dois volumes de etanol absoluto para a precipitação do DNA em banho de gelo durante 15min. Após a centrifugação a 13.000rpm por 15min, o sobrenadante foi descartado, volatilizado o etanol e o DNA foi ressuspendido em 20µL de H₂O miliQ estéril e armazenado a 4°C até o momento de uso (GOMES et al., 1998).

As reações da PCR foram realizadas em duplicata e volume final de 20µL contendo Tris-HCl 10mM (pH 9.0), Triton X-100 0,1%, KCl 75mM, MgCl₂ 3,5mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, *Sigma Chemical Company, Missouri, USA*), 1U de *Taq* DNA polimerase (*Promega, USA*), 25pmoles de cada iniciador da reação e 2µL do DNA (GOMES et al., 1998). As sequências da região constante dos minicírculos do kDNA constituíram o alvo da reação com os iniciadores 121 (5'-AAATAATGTACGGG(G/T)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') (DEGRAVE et al., 1988). O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 95°C (5min), 35 ciclos de

desnaturação a 95°C (1min), anelamento a 65°C (1min), extensão a 72°C (1min) e extensão final por 10min em termociclador (*Mastercycler gradient-Eppendorf, Hamburg, Germany*). As etapas de extração do DNA e mistura da reação da PCR foram monitoradas com controles positivos e negativos. Como controles positivos foram utilizados 2µL de DNA de cultura acelular do *T. cruzi* da cepa CL (1ng/1µL) em um tubo separado com a mesma mistura da reação e controle negativo contendo a mistura dos reagentes sem DNA. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% corados pela prata (SANTOS, PENA & EPPLIN, 1993) e o tamanho das bandas amplificadas foi monitorado por marcador de peso molecular de 100pb (*Ladder, Invitrogen, USA*). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram um padrão de banda de 330 pares de bases (pb). Para evitar contaminações, cada etapa da reação foi realizada em ambientes separados, utilizando reagentes e equipamentos destinados exclusivamente para cada uma delas.

4.3.3 PCR-Multiplex

A PCR-Multiplex foi realizada para o diagnóstico diferencial do *T. cruzi* e do *T. rangeli* conforme descrita por Souto, Vargas e Zingales (1999), utilizando os iniciadores D72 (5'-TTTGAATGGTCACCGAACAGT-3'), D75 (5'-GATGCACTTGGTTGGCGTAG-3') e RG3 (5'-GGCCAAAGGGTAAGGCTC-3') em um volume final de 22µL contendo Tris-HCl 10mM (pH 9.0), Triton X-100 0,1%, MgCl₂ 3,5mM, 0,4mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, *Sigma, USA*), 5U de Platinum® *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies, Califórnia, USA*), 17pmoles de cada iniciador da reação e 2µL de DNA molde. O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94°C (4min), 30 ciclos de desnaturação a 94°C (1min), anelamento a 60°C (1min) e extensão a 72°C (1min) e, extensão final por 7min em termociclador (*Mastercycler Gradient-Eppendorf, Hamburg, Germany*). As reações foram monitoradas com controles positivos, utilizando 2µL de DNA de cultura acelular do *T. cruzi* das cepas de referência: Colombiana (corresponde a DTU-Discrete typing units I ou TcI), JG (DTU II ou TcII) e *T. rangeli* (3ng/µL), e controle negativo contendo a mistura dos reagentes sem DNA. O tamanho dos produtos amplificados pela PCR foi monitorado pelo marcador de peso molecular de 100pb (*Ladder, Invitrogen, USA*) e os amplicons visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% (FERNANDES et al., 2001) corados pela prata (SANTOS, PENA & EPPLIN, 1993). Esses iniciadores permitem distinguir TcI (que amplifica um fragmento de ~250pb), TcII (que amplifica um fragmento de ~265pb) e *T. rangeli* (que amplifica um fragmento de ~210pb) (SOUTO, VARGAS & ZINGALES, 1999).

4.4 Identificação da fonte alimentar dos triatomíneos

4.4.1 Comparação dos métodos de extração do DNA

Inicialmente a identificação da fonte alimentar foi realizada a partir de amostras do conteúdo intestinal puro com o DNA total extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*), conforme as instruções do fabricante. A concentração do DNA genômico foi determinada utilizando o aparelho *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, Waltham, USA*) e o grau de pureza determinado pela reação de absorvância de 260/280nm de comprimento de onda.

Para ampliar o número de amostras de triatomíneos capturados no campo com a fonte de alimentação identificada, inicialmente foi realizada a extração do DNA utilizando o *Kit* anteriormente citado em amostras do conteúdo intestinal de triatomíneos diluída em Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M, porém, a reação de PCR não funcionou. Posteriormente, a extração do DNA das amostras foram padronizadas usando o método de Fenol-Clorofórmio. Nesta extração foram utilizados cerca de 50 ovos de *T. brasiliensis* da colônia pertencente ao insetário do LATEC/IRR/FIOCRUZ/MINAS. Após a eclosão das ninfas foram formados três grupos contendo 10 ninfas de primeiro estágio, sendo alimentados da seguinte forma: grupo 1 com *Columba livia* (pombo); grupo 2 com *Mus musculus* (camundongo); e grupo 3 com *Gallus gallus* (galinha). Esses animais foram anestesiados antes do processo de alimentação com 60 - 80mg de ketamina (Cloridrato de cetamina, Vetnil) + 8-15mg de xilazina (Dopaser, Vetnil) por kg de massa corporal do animal, de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ), protocolo P-27/14-3. A preferência pela escolha de ninfas de primeiro estágio recém-eclodidas garantiu o controle sobre o tipo de alimentação que foi oferecida para cada grupo. Após a alimentação, as ninfas foram redistribuídas em dois grupos, cada um contendo cinco exemplares alimentados com as diferentes fontes. Esses insetos foram dissecados com auxílio de pinça e tesoura, e o intestino foi removido e armazenado em tubo de 1,5mL (Item 4.3.1). No primeiro grupo, o conteúdo intestinal foi diluído em 400µL de solução de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M e a extração de DNA realizada segundo Gomes et al. (1998) (Item 4.3.2). No segundo grupo, o DNA total foi extraído diretamente do conteúdo intestinal utilizando o mesmo *kit* mencionado acima de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.2 PCR do gene mitocondrial do RNA ribossomal 12S

A reação da PCR foi realizada em um volume final de 25µl, contendo 10-40ng de DNA genômico, 2,5µL de *Buffer* 10×; 2,5µL de dNTP 2,5mM; 0,75µL de MgCl₂ 50mM; 2,5µL de cada iniciador 10pmol; 0,25µL de *Taq* Platinum 0,5U/µl (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Os iniciadores utilizados foram (L1085 5'-CCCAAAGTGGGATTAGATACCC-3' e H1259 5'-GTTTGCTGAAGATGGCGGTA-3'), que amplificam fragmentos de 215pb e 244pb. Esses iniciadores são universais para animais vertebrados e foram desenhados com base nas regiões conservadas do *locus* 12S do rRNA (KITANO et al., 2007). Para cada reação de PCR foram usados controles negativo (sem DNA) e positivo (amostra de DNA extraído do conteúdo intestinal de um triatomíneo alimentado em *G. gallus*). O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 95°C (5min), 35 ciclos de desnaturação a 95°C (30s), anelamento a 58°C (30s) e extensão a 72°C (1min) com extensão final a 72°C (7min) em termociclador (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os produtos amplificados foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corados pela prata (SANTOS, PENA & EPPLIN, 1993). O DNA do bacteriófago Ø-X174 digerido pela enzima de restrição *HaeIII* foi utilizado como marcador de peso molecular para monitorar o tamanho das bandas amplificadas. As amostras positivas na PCR tiveram o seu produto purificado com o *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*), seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação, a qualidade e a concentração do DNA foram medidas por espectrofotômetro usando o *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific, Waltham, USA*) e, em seguida, as amostras foram sequenciadas.

4.4.3 Reação de sequenciamento

O fragmento de DNA purificado foi sequenciado utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits* (*Applied Biosystems, CA, USA*). Para esta reação foram utilizados 5-20ng do DNA purificado, 1µL dos iniciadores *Forward* ou *Reverse* (5pmol), 1,75µL de tampão *Save Money* (200mMTris-HCl, pH 9; 5mM MgCl₂), 0,5µL de *BigDye* e água deionizada estéril para completar 10µL. Para cada iniciador foi realizada uma reação de sequenciamento. O produto da PCR de sequenciamento foi precipitado pela adição de 1µL de EDTA 125mM em cada poço, 1µL de acetato de amônia 7,5M ou acetato de sódio 3M e 50µL de etanol 100%. Em seguida, a placa foi selada com o adesivo, vortexada rapidamente e incubada por 15min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas por 45min a 3.700rpm (*Eppendorf 5804 R, Hamburg, Germany*) em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, 100µL de etanol 70% foram

adicionados às amostras, que foram centrifugadas a 3.700rpm por 15min a temperatura ambiente e os seus sobrenadantes descartados. As amostras foram ressuspensas em formamida HI-DI (*Applied Biosystem, Torrance, California, USA*) e processadas em sequenciador automático, na plataforma ABI 3730 (*Applied Biosystems, Torrance, California, USA*) do IRR/FIOCRUZ/MINAS.

4.4.4 Análise das sequências

As sequências obtidas foram avaliadas a partir da análise do eletroferograma no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*® V. 7.0.9.0 (HALL, 1999). Para identificação da fonte alimentar foi realizada uma comparação entre as sequências obtidas neste estudo e as que foram depositadas no *GeneBank* utilizando a ferramenta BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.5 Aspectos ecológicos de espécies de triatomíneos do ambiente silvestre

4.5.1 Área de estudo

Este estudo foi conduzido na Estação Ecológica do Seridó (ESEC-Seridó) localizada no município de Serra Negra do Norte (06° 34' 36,2" S e 37° 15' 20,7" W) na mesorregião Central do RN (**Figura 5**), no período de 2010 a 2016. A ESEC-Seridó é uma Unidade de Conservação que abrange uma área de Caatinga de 1.166,38 hectares (VARELA-FREIRE, 2002). É caracterizada por apresentar um clima semiárido (AB'SÁBER, 1974), estação chuvosa entre os meses de março e maio, e precipitação variando entre 500 e 800mm/ano. As temperaturas médias anuais variam de 28°C-30°C, podendo exceder 40°C, e a temperatura mínima varia entre 17°C-20°C. A umidade relativa do ar varia entre 30-50% na estação seca e 80-90% na estação chuvosa (VARELA-FREIRE, 2002). A vegetação é do tipo hiperxerófila arbórea-arbustiva onde vários afloramentos rochosos são encontrados cobertos durante a estação chuvosa ou expostos durante a estação seca, após a queda das folhas (VELLOSO, SAMPAIO & PAREYN, 2002).

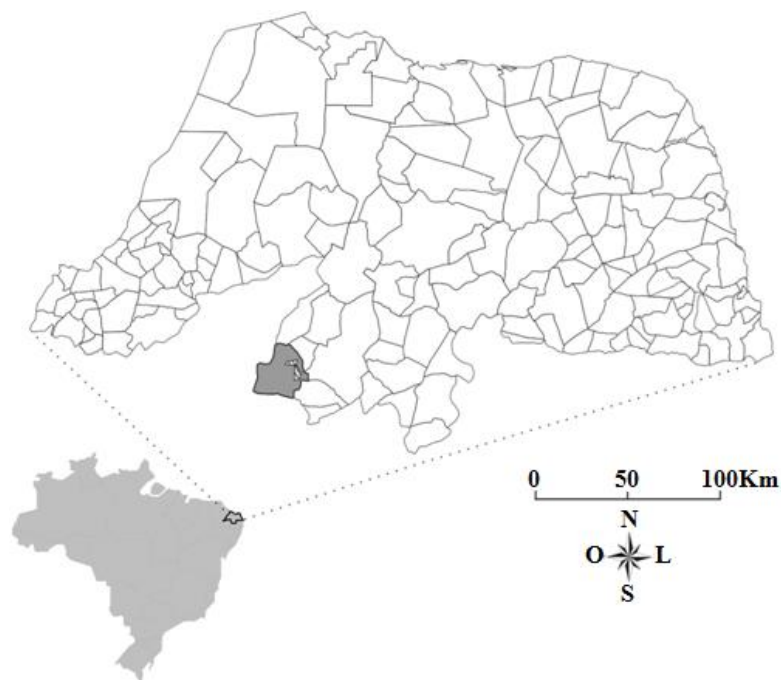


Figura 5 - Mapa do estado do Rio Grande do Norte destacando em cinza escuro o município de Serra Negra do Norte e a Estação Ecológica do Seridó.
 Fonte: IBGE (2017) modificado pela autora.

Nesse local foram investigados três afloramentos de rochas (**Figura 6**) e cascas e troncos de árvores. Nesses ecótopos foi observada a presença de pequenos roedores silvestres, uma variedade de aves e lagartos, aranhas, escorpiões, cobras e diversas espécies de insetos. Próximo a alguns afloramentos há uma fazenda habitada com vários animais domésticos. As pesquisas foram conduzidas no período diurno e noturno e sempre realizadas com três colaboradores do trabalho e um técnico da ESEC-Seridó. As capturas foram realizadas manualmente com auxílio de pinça e lanterna, sem o uso de substâncias desalojantes e armadilhas. Os insetos coletados foram acondicionados em recipientes de plástico devidamente etiquetados (com data e ambiente) e encaminhados para o LaBioParChagas/CCS/UFRN, onde foram identificados conforme os parâmetros da chave de identificação (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Em seguida, o conteúdo intestinal dos insetos foi analisado para a pesquisa por tripanossomatídeos (Item 4.3.1 e 4.3.2) e estudo da fonte alimentar (Item 4.4.1).



Figura 6 - Captura de triatomíneos em afloramento de rochas na Estação Ecológica do Seridó no município de Serra Negra do Norte/RN.

Fonte: Acervo próprio

4.6 Genotipagem do *T. cruzi*

Os isolados do *T. cruzi* provenientes da xenocultura foram cultivados em meio LIT até a obtenção de 10^7 /mL de epimastigotas. As culturas foram lavadas três vezes em tampão KRT (*Krebs-Ringer-Tris*) pH 7,2 e concentradas por centrifugação a 2.500rpm (*Eppendorf 5450R Hamburg, Germany*) por 15min a 4°C. O sedimento (massa úmida) de cada isolado foi armazenado em triplicata a temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA. A extração de DNA (MACEDO et al., 1992) foi realizada utilizando a massa úmida de cada amostra do *T. cruzi* e o DNA foi quantificado em um fluorômetro (*Qubit® 2.0 Fluorometer - Life Technologies*) para a concentração final de cada amostra ser ajustada para 3ng/μL e estocada a 4°C até o momento do uso.

A caracterização dos isolados do *T. cruzi* foi realizada usando três marcadores genéticos segundo protocolo descrito previamente (D'ÁVILA et al., 2009): domínio divergente do gene 24Sα do DNA ribossomal (rRNA) (SOUTO & ZINGALES, 1993); a subunidade II do citocromo oxidase do gene mitocondrial (COII) (FREITAS et al., 2006); e o espaçador intergênico dos genes miniexon do *T. cruzi* (SL-IR) (BURGOS et al., 2007). Para cada reação da PCR foram utilizados como controles cepas e clones do *T. cruzi* como referência (**Tabela 1**). Os produtos das PCRs foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados com uma solução de nitrato de prata (SANTOS, PENA & EPPLIN, 1993).

Tabela 1 - Características das cepas e clones de referência do *Trypanosoma cruzi* e dos marcadores genéticos.

Cepas e clones do <i>T. cruzi</i>	Marcadores genéticos			DTU do <i>T. cruzi</i>
	24Sα rRNA [*] (pb)	COII ^{**} (haplotype/pb)	SL-IR ^{***} (pb)	
Col1.7G2 ^a	110	A/30, 81, 264	150	TcI
JG ^b	125	C/81, 212	150	TcII
RN19 ^c	110	B/81, 294	200	TcIII
AM64 ^d	110/119	B/81, 294	200	TcIV
3253 ^e	110 + 125	B/81, 294	150	TcV
CL-Brener ^f	125	B/81, 294	150	TcVI

^aFREDERICI, ABELMANN & NEVA, 1964; ^bLAGES-SILVA et al., 2001; ^cCÂMARA et al., 2010; ^dMONTEIRO et al., 2010; LAGES-SILVA et al., dados não publicados; ^eZINGALES et al., 1997; ^fSOUTO & ZINGALES (1993); ^{**}FREITAS et al. (2006); ^{***}BURGOS et al. (2007); pb: pares de bases; DTU: *discrete typing units*

4.7 Análise morfológica e taxonômica dos triatomíneos

Nesta análise foram utilizados espécimes de *T. brasiliensis* (RN), sete de *Triatoma* sp. (RN) (**Anexo 2**), um de *T. petrocchiae* (CE) e quatro de *T. melanica* (MG) capturados em ecótopos naturais e artificiais. Para este estudo somente um exemplar de *T. petrocchiae* proveniente do estado do Ceará foi utilizado devido à dificuldade de captura dessa espécie. Esses insetos foram identificados (LENT & WYGODZINSKY, 1979; COSTA et al., 2013), medidos, morfológicamente comparados e tiveram o gene citocromo (*Cyt b*) e o espaçador interno transcrito (ITS-1) sequenciados.

4.7.1 Morfologia

Na análise morfológica foram utilizadas as características morfológicas consideradas para o diagnóstico das espécies *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae*, segundo Lent e Wygodzinsky (1979) e Galvão (2014): **(1)** tamanho da cabeça em relação ao pronoto; **(2)** inserção do tubérculo antenífero; **(3)** tamanho do primeiro artigo antenal em relação ao ápice do clipeo; **(4)** espessura do rosto e presença de cerdas; **(5)** manchas no pescoço; **(6)** coloração do pronoto e presença de manchas; **(7)** características do escutelo; e **(8)** características das pernas. Uma matriz de presença/ausência de caracteres morfológicos foi construída e um fenograma foi gerado. A análise computacional foi realizada pelo programa NTSYS (ROHLF, 1998) utilizando o coeficiente de associação de Dice (DICE, 1945), que mede as coincidências e as diferenças dos caracteres entre as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), e o fenograma foi construído com o UPGMA (Método de Agrupamento aos Pares Utilizando Médias Aritméticas) (SNEATH & SOKAL, 1962, 1973).

4.7.2 Relações taxonômicas

A extração de DNA foi realizada por maceração de duas patas de cada inseto adulto e preservadas em freezer a -70°C , utilizando o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções do fabricante recomendadas para tecido animal. A concentração do DNA genômico foi determinada utilizando o aparelho NanoDrop® 2000 Thermo Scientific®. A amplificação dos fragmentos do DNA do *Cyt b* e do ITS-1 foi realizada a partir de uma PCR utilizando os seguintes iniciadores:

Cyt b: CYTB7432F (5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC-3')

CYTB7433R (5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA-3')

(LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2004)

ITS: Forward: (5'-TACACACCGCCCGTCGCTACTA-3')

Reverse: (5'-GAGTGATCCGCGCTCAGGGTAATA-3')

(YA-JIE, DE-XING & LI-JUN, 2003)

As reações foram realizadas em volume final de $25\mu\text{L}$ contendo Tris-HCl 10mM pH 9,0, Triton X-100 0,1%, 1,5mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Sigma Chemical Company, Missouri, USA), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Califórnia, USA), 10pmoles de cada iniciador da reação e 10ng do DNA. O produto da PCR foi estocado em freezer (-20°C) até o momento do uso. As amostras foram avaliadas em duplicata e todas as reações foram acompanhadas de controle negativo (componentes da reação exceto o DNA). O DNA do *T. sordida* (MG) foi utilizado como controle externo da reação. O programa de amplificação do *Cyt b* foi constituído de uma desnaturação inicial a 94°C (5min), 35 ciclos de desnaturação a 94°C (30s), anelamento a 47°C (30s) e extensão a 72°C (1min) com extensão final por 7min em termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA). O programa de amplificação do ITS-1 foi constituído de uma desnaturação inicial de 94°C (5min), seguida de 40 ciclos contendo desnaturação a 94°C (45s), anelamento a 53°C (2min) e extensão a 72°C (1min), finalizando com extensão final a 72°C (7min), também realizado em termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os produtos amplificados foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pela prata (SANTOS, PENA & EPPLIN, 1993). O DNA do bacteriófago \emptyset -X174 digerido pela enzima de restrição *HaeIII* foi utilizado como marcador de peso molecular para monitorar o tamanho das bandas amplificadas. Os produtos das PCRs

foram purificados com o *kit* EXO/SAP (enzimas ‘*Exonuclease I*’ e *Shrimp Alkaline Phosphatase*) (*Affymetrix, California, USA*) permitindo uma pureza eficiente na reação de sequenciamento. A purificação foi realizada utilizando 1U de EXO/SAP e 5,0 μ L do produto da PCR inicialmente a 37°C por 90min, seguido de 80°C por 20min (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Após essa etapa, a reação de sequenciamento foi realizada conforme o item 4.4.3 em sequenciador automático ABI 3730.

4.7.3 Análise das sequências

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada a partir da análise do eletroferograma no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*® V. 7.0.9.0 (HALL, 1999) e analisadas com sequências depositadas no *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências resultantes deste trabalho foram comparadas com 20 sequências de exemplares pertencentes a espécies inseridas no complexo *T. brasiliensis* depositadas no banco de dados do *GeneBank*, utilizadas para dar suporte às análises taxonômicas (**Anexo 3**). O *base calling* destes sequenciamentos foi realizado utilizando o programa *Phred* (EWING et al., 1998) onde apenas as bases com qualidade de *Phred* 30 (um erro em 1000 bases) foram recuperadas. Essas sequências foram utilizadas para a construção de *contigs* utilizando o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). As sequências do gene *Cyt b* e ITS-1 foram alinhadas utilizando o MAFFT (EDGAR, 2004a e b) de forma a identificar as regiões conservadas e divergentes entre elas. Para uma melhor comparação, apenas as regiões presentes em todas as amostras foram recuperadas utilizando o programa *Gblocks* (CASTRESANA, 2000). Para identificar o melhor modelo de distribuição nucleotídica que se adequa aos dados foi utilizado o programa *Jmodeltest* (POSADA, 2003, 2008). O modelo Hasegawa 1985 (HKY) foi selecionado com distribuição gama (G) de 0.4. Desta forma, a filogenia foi estimada por máxima verossimilhança utilizando o programa *PhyML* (GUINDON et al., 2010) e o modelo de distribuição nucleotídica KKY+G 0.4, com 1000 repetições de *bootstrap*. A árvore filogenética foi gerada com o programa *Figtree* v1. 4.2.

5 RESULTADOS

Para melhor entendimento, os resultados desta tese foram divididos em capítulos:

Capítulo 1- Avaliação dos dados referentes às capturas de triatomíneos realizadas no período de 2005 a 2015, disponibilizados pela SESAP/RN

Este capítulo compreende os resultados sobre o número de municípios que realizaram a busca ativa, o número de UDs positivas e borrifadas, os indicadores entomológicos, as espécies de triatomíneos capturadas nas UDs, a infecção natural por tripanossomatídeos desses vetores e a sua distribuição.

Capítulo 2 - Avaliação dos dados referentes às capturas de triatomíneos realizadas no município de Caraúbas no período de 2010 a 2016

Este capítulo inclui os dados referentes à busca ativa e controle de triatomíneos no município de Caraúbas a partir dos dados disponibilizados pela SESAP/RN.

Capítulo 3 - Avaliação dos aspectos ecológicos dos triatomíneos encontrados nos ambientes silvestre e antrópico e genotipagem dos isolados do *T. cruzi*.

Neste capítulo foram avaliados os dados primários de capturas de triatomíneos realizadas pelo autor, os quais mostram os principais ecótopos dos triatomíneos nos ambientes silvestre e antrópico, os índices de infecção natural pelo *T. cruzi* e as principais fontes alimentares. Além disso, apresenta os resultados da genotipagem dos isolados do *T. cruzi* obtidos de triatomíneos silvestres e do ambiente antrópico.

Capítulo 4 – Análise morfológica etaxonômica de *Triatoma* sp.

Neste capítulo apresentamos os resultados referentes às relações taxonômicas de exemplares de *Triatoma* sp. capturados na ESEC-Seridó com *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae*.

5.1 Capítulo 1: Avaliação dos dados referentes as capturas de triatomíneos realizadas no período de 2005 a 2015, disponibilizados pela SESAP/RN

5.1.1 Avaliação da vigilância entomológica (busca ativa e controle vetorial)

No período de 2005 a 2015, a busca ativa foi realizada nas UD's de 113 (67,7% - 113/167) municípios do RN, pelo menos uma vez, dos quais 110 registraram a presença de triatomíneos. Todos os municípios considerados de alto risco (n = 36) para a transmissão do *T. cruzi* realizaram a busca ativa e registraram a presença do vetor, assim como a maioria dos municípios de médio risco (n = 64) (**Figura 7**).

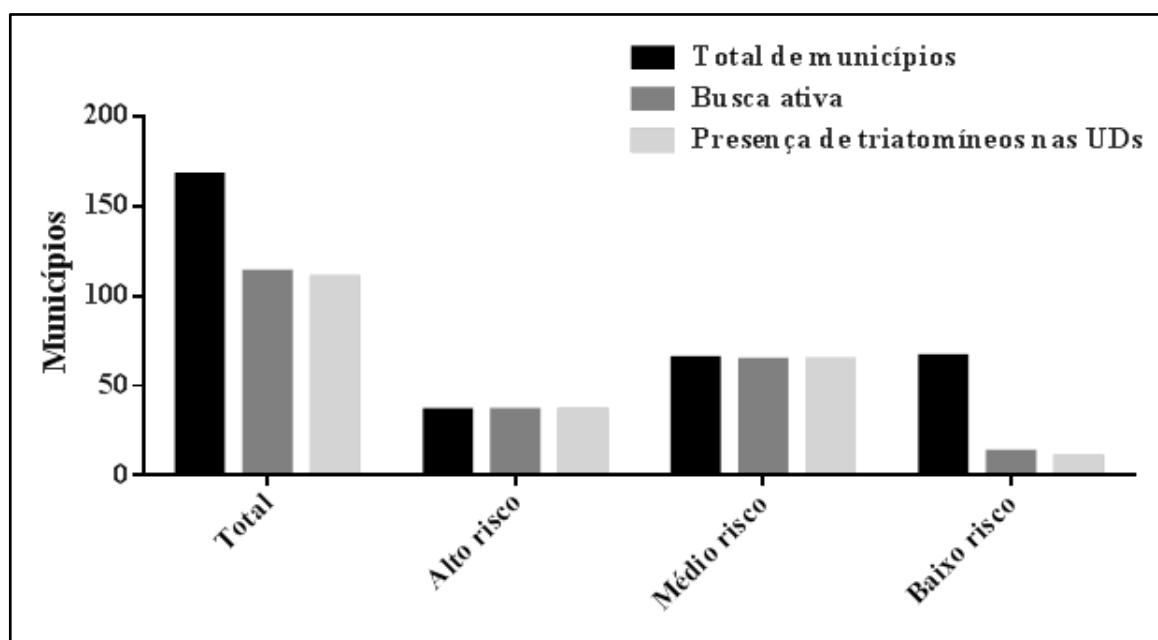


Figura 7 - Número de municípios do RN que realizaram a busca ativa nas UD's e registraram a presença de triatomíneos por estratificação de risco de transmissão do *T. cruzi*, no período de 2005 a 2015.

A **tabela 2** mostra que 30,5% (11/36) dos municípios de alto risco realizaram a busca ativa nas UD's de forma ininterrupta nos 11 anos avaliados. Em relação aos municípios de médio risco, 16,9% (11/65) exerceram essa atividade durante 10 e 11 anos. Em relação aos municípios de baixo risco, a maioria não realizou a busca ativa (80,3% - 53/66). O número de municípios que realizaram a busca ativa variou de 95 em 2007 para 64 em 2015 ao longo dos anos. Nota-se que em 2015 houve uma diminuição no número de municípios que realizaram a busca ativa (**Figura 8**) e, conseqüentemente, no número de UD's pesquisadas. Mesmo com essa diminuição, o número de UD's positivas aumentou nos últimos anos (**Tabela 2**). A ocorrência de ninfas no intradomicílio foi registrada em todos os anos avaliados, evidenciando

a presença de colônias domiciliares. No entanto, nem todas as UDs infestadas foram borrifadas.

Tabela 2 - Pesquisa da infestação (busca ativa) de triatomíneos nas UDs no Rio Grande do Norte, de acordo com a estratificação de risco, segundo dados fornecidos pela SESAP, no período de 2005 a 2015.

N° de avaliações realizadas	N° de municípios		
	Alto risco	Médio risco	Baixo risco
11	11 (30,5)	11 (16,9)	0
10	7 (19,4)	11 (16,9)	0
9	4 (11,1)	5 (7,7)	0
8	1 (2,8)	5 (7,7)	1 (1,5)
7	4 (11,1)	10 (15,4)	1(1,5)
6	0	10 (15,4)	0
5	1 (2,8)	3 (4,6)	0
4	5 (13,9)	5 (7,7)	1 (1,5)
3	2 (5,6)	3 (4,6)	2(3,0)
2	1 (2,8)	1 (1,5)	4 (6,1)
1	0	0	4 (6,1)
Nenhum	0	1 (1,5)	53 (80,3)
Total de municípios	36	65	66

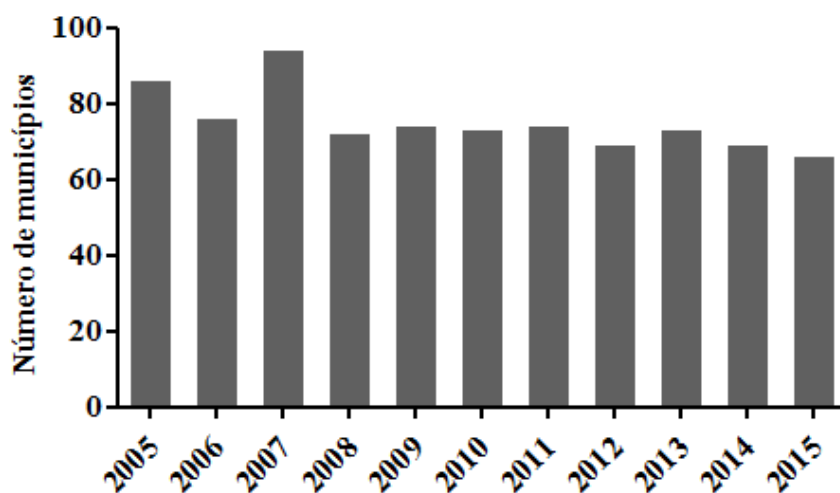


Figura 8 - Número de municípios do estado do RN que realizaram as atividades de busca ativa anualmente.

Contudo, o percentual de UDs infestadas borrifadas foi sempre maior que 75% (**Tabela 3**). Em relação aos indicadores entomológicos, nós observamos uma variação nos índices de infestação total, intradomiciliar e peridomiciliar ao longo dos anos, que passaram a ser mais elevados em 2015, 7%, 2,6% e 4,3%, respectivamente. Por outro lado, nesse mesmo ano também foi registrado o menor índice de colonização, correspondendo a 19%, que ainda é considerado elevado (**Tabela3**).

Tabela 3 – Avaliação da infestação, colonização, borribação das UD's e indicadores entomológicos.

Unidades Domiciliares (UDs)	Ano										
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
UDs existentes	84.418	75.458	84.361	51.409	58.096	60.296	47.495	52.769	60.676	50.995	45.839
UDs pesquisadas	75.296	67.430	75.086	45.319	63.729	52.164	39.227	45.065	44.374	43.795	42.796
UDs infestadas	3.671	3.332	2.855	2.148	1.992	2.675	1.890	2.044	2.074	1.997	2.996
UDs borrifadas	3.001	2.843	2.772	1.932	1.676	2.436	1.476	1.847	1.747	1.627	2.341
% UD's borrifadas	81,7	85,3	97,1	90	84,1	91	78,1	90,3	84,2	81,5	78,1
(Índice de infestação)	(4,9%)	(4,9%)	(3,8%)	(4,7%)	(3,1%)	(5,1%)	(4,8%)	(4,5%)	(4,7%)	(4,5%)	(7,0%)
Infestação do intra	1.631	1.044	1.003	758	644	773	425	534	763	602	1.101
(Índice de infestação – Intra)	(2,2%)	(1,5%)	(1,3%)	(1,7%)	(1,0%)	(1,5%)	(1,1%)	(1,2%)	(1,7%)	(1,4%)	(2,6%)
Infestação do peri	2.479	2.431	1.979	1.475	1.309	1.784	1.465	1.541	1.291	1.444	1.848
(Índice de infestação – Peri)	(3,3%)	(3,6%)	(2,6%)	(3,2%)	(2,0%)	(3,4%)	(3,7%)	(3,4%)	(2,9%)	(3,3%)	(4,3%)
UDs com ninfas - Intra	529	387	297	302	177	191	121	198	221	179	209
(Índice de colonização – Intra)	(32,4%)	(37,1%)	(29,6%)	(39,8%)	(27,5%)	(24,7%)	(28,5%)	(37,1%)	(29,0%)	(29,7%)	(19,0%)

Intra: intradomicílio; Peri: peridomicílio

5.1.2 Espécies de triatomíneos capturadas nas UDs e índice de infecção por tripanossomatídeos

Um total de 51.569 espécimes de triatomíneos foi capturado nas UDs dos municípios do RN e as espécies registradas foram *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchiai*, *P. lutzi*, *P. megistus* e *R. nasutus*. As espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* foram as mais frequentes, correspondendo a 47,20% (24.343/51.569) e 40,22% (20.742/51.569) do total de espécimes capturados, respectivamente. Já a presença de *P. megistus* foi raramente notificada durante os 11 anos avaliados. Nota-se que *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. lutzi* e *R. nasutus* foram capturados nas UDs em todos os anos avaliados, enquanto o *T. petrocchiai* foi capturado somente no período de 2005 a 2010 (**Tabela 4**).

A maioria dos exemplares foi capturada no peridomicílio (78,31% - 40.386/51.569), onde *T. brasiliensis* (42,74% - 17.263/40.386) e *T. pseudomaculata* (42,65% - 17.226/40.386) foram mais frequentes (**Tabela 5, Anexo 4**). Ninfas de *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchiai*, *P. lutzi* e *R. nasutus* foram encontradas no intradomicílio e no peridomicílio, indicando a ocorrência de colonização em ambos os ambientes. No intradomicílio observou-se um número mais elevado de ninfas de *T. brasiliensis* (n = 2.861) capturadas e no peridomicílio de *T. pseudomaculata* (n = 6.394). Em relação ao *P. megistus*, somente exemplares adultos foram capturados em ambos os ambientes (**Tabela 5, Anexos 4, 5 e 6**).

O exame direto por microscopia óptica detectou a infecção por tripanossomatídeos em 1.105 espécimes (2,4%). A taxa de infecção mais elevada foi do *T. brasiliensis* (3,2%), seguido por *R. nasutus* (1,7%) e *T. pseudomaculata* (1,6%) (**Tabela 5, Anexo 7**). A presença de triatomíneos infectados foi registrada em 61,9% (70/113) dos municípios investigados, a maioria deles das mesorregiões Oeste e Central (**Figura 9**).

Tabela 4 - Número anual e total de triatomíneos capturados, por espécies, nas unidades domiciliares dos municípios do estado do Rio Grande do Norte entre 2005 a 2015 (SESAP-RN).

Espécie de triatomíneos	Ano											Total	
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	n°	%
<i>Triatoma brasiliensis</i>	3.618	3.125	2.261	2.058	1.548	1.834	1.363	2.046	2.091	1.956	2.443	24.343	47,2
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	3.348	2.702	2.245	1.710	1.537	1.944	1.005	1.643	1.590	1.344	1.674	20.742	40,2
<i>Triatoma petrocchiae</i>	138	33	48	12	7	4	0	0	0	0	0	242	0,5
<i>Panstrongylus megistus</i>	0	0	5	0	0	4	1	2	2	1	2	17	0,03
<i>Panstrongylus lutzi</i>	360	181	277	169	136	272	133	370	258	168	207	2.531	4,9
<i>Rhodnius nasutus</i>	540	607	559	213	250	226	103	234	357	284	321	3.694	7,2
Total	8.004	6.648	5.395	4.162	3.478	4.284	2.605	4.295	4.298	3.753	4.647	51.569	100

Tabela 5 - Número de triatomíneos capturados por espécie e estágio evolutivo no intradomicílio e peridomicílio e índice de infecção global por tripanossomatídeos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de 2005 a 2015 (SESAP-RN).

Espécie	Intradomicílio				Peridomicílio				Total coletado		Índice de infecção global
	A	N	T	%	A	N	T	%	n°	%	
<i>T. brasiliensis</i>	4.219	2.861	7.080	63,31	11.215	6.048	17.263	42,74	24.343	47,20	3,2 (733/22.507)
<i>T. pseudomaculata</i>	2.455	1.061	3.516	31,44	10.832	6.394	17.226	42,65	20.742	40,22	1,6 (307/19.277)
<i>T. petrocchiae</i>	50	2	52	0,46	125	65	190	0,47	242	0,47	1,3 (2/150)
<i>P. lutzi</i>	174	40	214	1,91	1.831	486	2.317	5,74	2.531	4,91	0,7 (14/1.937)
<i>P. megistus</i>	10	0	10	0,10	7	0	7	0,02	17	0,03	0 (0/17)
<i>R. nasutus</i>	106	205	311	2,78	2.375	1.008	3.383	8,38	3.694	7,17	1,7 (49/2.915)
Total	7.014	4.169	11.183	21,69	26.385	14.001	40.386	78,31	51.569	100	2,4 (1.105/46.803)

A: adulto; N: ninfas; T: total

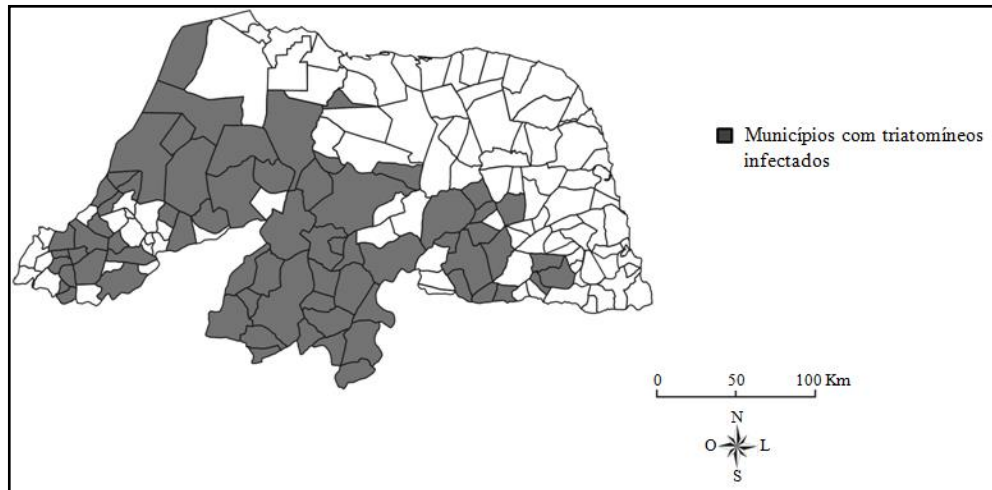


Figura 9 – Mapa do estado do Rio Grande do Norte destacando em cinza escuro os municípios com registro de triatomíneos infectados nas UDs no período de 2005 a 2015.

5.1.3 Distribuição das espécies de triatomíneos nos municípios do RN

As espécies *T. pseudomaculata*, *T. brasiliensis*, *P. lutzi* e *R. nasutus* apresentaram ampla distribuição geográfica, sendo registrados em 107, 106, 96 e 79 municípios, respectivamente. A ocorrência do *T. petrocchiai* foi restrita a 25 municípios localizados nas mesorregiões Oeste e Central. A espécie que apresentou baixa dispersão no estado foi *P. megistus*, cujos registros se limitaram a cinco municípios da mesorregião Oeste (Apodi, Assú, Caraúbas, São Rafael e Upanema) (**Figura 10**).

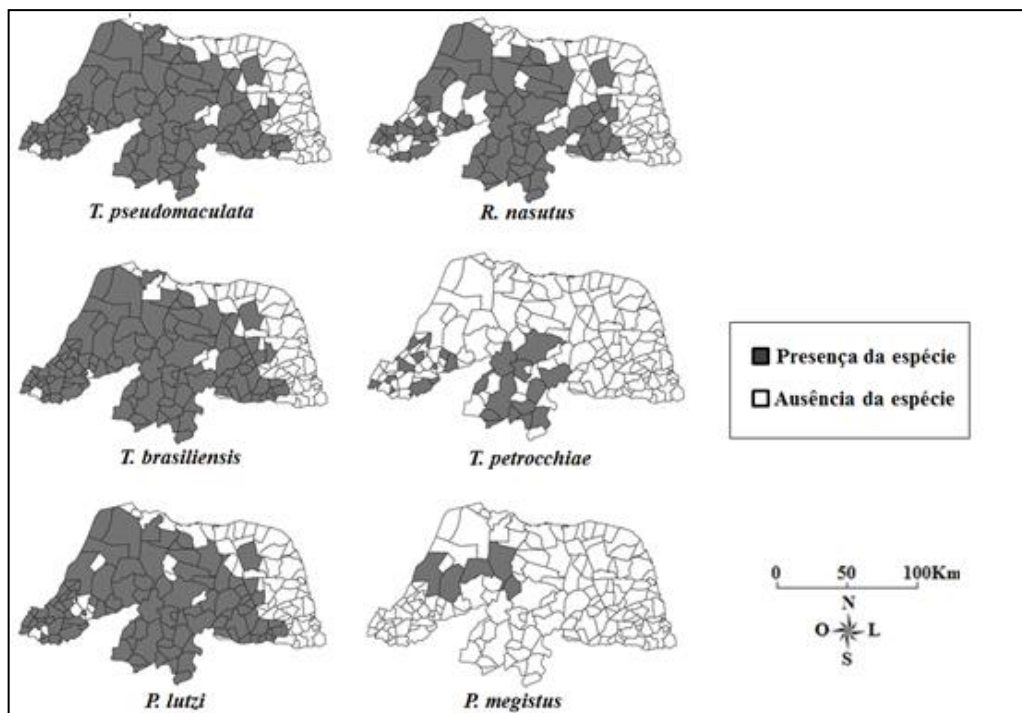


Figura 10 - Distribuição das espécies de triatomíneos capturadas, pelo menos uma vez, em ambientes artificiais nos municípios do estado do RN, no período de 2005 a 2015.

5.2 Capítulo 2: Avaliação dos dados referentes as capturas de triatomíneos realizadas no município de Caraúbas no período de 2010 a 2016

5.2.1 Vigilância entomológica, Infestação e infecção natural de triatomíneos no município de Caraúbas

A análise dos dados epidemiológicos de Caraúbas mostrou que as atividades de vigilância foram realizadas em 107 localidades das 260 existentes, no período de 2010 a 2016. O **Quadro 1** mostra que as atividades de vigilância (busca ativa) no município ocorreram de forma descontínuas. Nos anos de 2010, 2011 e 2012, várias localidades tiveram registros de triatomíneos nas UDs, porém, nota-se que no ano seguinte, a VE não foi realizada. Nas localidades onde houve regularidade do controle foi observada a persistência de triatomíneos em UDs ao longo do período, mesmo com a atuação mais frequente da vigilância, tais como Fazenda Belém, Fazenda Salão, Sítio Cachoeirinha, Xique Xique, Xique Xique de Cima, Fazenda Pitombeira, Fazenda Boa Água, Sítio Carnaubinha, Sítio Pedra Branca, Sítio Riacho do Mulato, Fazenda Olho d'Água, Fazenda Floresta, Fazenda Guanabara, Fazenda Santo Antônio, Sítio Serrote Vermelho, Sítio Pedras e Sítio Glênio Sá.

Quadro 1 - Localidades de Caraúbas/RN com busca ativa de triatomíneos realizada no período de 2010 a 2016.

Localidades	Ano						Localidades	Ano						Localidades	Ano								
	10	11	12	13	14	15		16	10	11	12	13	14		15	16	10	11	12	13	14	15	16
Bairro Liberdade	■						Sítio Canafistula		■						Sítio Pedras						■	■	
Fazenda Belém	■		■	■	■		Pov. Mirandas		■						Fazenda Serigado de Acácio						■	■	
Sítio Nova Olinda							Sítio São Braz								Fazenda Santo Antônio I								
Sítio Pedra Grande	■						Fazenda Formosa								Fazenda Santo Antônio							■	■
Fazenda Oliveira							Fazenda Sombras Grandes								Sítio Lagoa do Junco								■
Sítio Pontal	■						Borracha		■						Sítio Serrote Vermelho							■	■
Fazenda Fortaleza	■	■					Igarapé		■						Sítio Glênio Sá							■	■
Fazenda Salão	■	■	■				Sítio Sombras Grandes		■						Sítio Boa Esperança								■
Sítio Baixa do Meio	■						Fazenda Olhos d'Água		■			■	■		Sítio Riacho das Carnaúbas								■
Sítio Baixa do Manoel	■						Sítio Pedro Mendes		■						Sítio Canto do Feijão								■
Sítio Baixa Grande	■						Sítio Firmeza								Sítio Belo Monte								■
Sítio Cachoeirinha de Cima	■	■					Fazenda Carnaubinha								Sítio Bela Vista								■
Sítio Cachoeirinha	■						Fazenda São Franciscode Linhares								Fazenda Piraquira								■
Fazenda Aroeira						■	Sítio Londrina			■					Fazenda Santa Maria								■
Sítio Cazumba							Fazenda São José de Oliveirinha				■				Fazenda Santa Luzia								■
Sítio Morada Nova							Fazenda São José de Manu						■		Sítio Jordão								■
Fazenda Tirol							Fazenda Salgado						■		Sítio Barra dos Coivaras								■
Sítio Pedra Grande	■						Fazenda Varzinha						■		Fazenda Riacho do Mulato								■
Fazenda Belos Aries							Fazenda Junquilha								Sítio Correios								■
Sítio Xique Xique		■	■				Fazenda Soledade								Sítio Dois Irmãos								■
Sítio Xique Xique de Cima							Fazenda Jerumenha								Sítio Brejinho								■
Fazenda Pitombeira							Sítio Timbaúba						■		Sítio Baixa do Inharé								■
Fazenda Boa Água		■				■	Fazenda Firmeza								Sítio Baixa do Feijão								■
St. Carnaubinha		■				■	Sítio PA Firmeza								Sítio Canta Galo								■
St. Olho d'Águinha							Fazenda Baixa Fria								Sítio São Francisco de Armando								■
Vila Petrolina							Fazenda Palestina								Fazenda Conceição								■
Sítio José Sotero							Sítio Retiro						■		Fazenda Cajueiro								■
Sítio Pedra Branca		■	■				Fazenda Quixaba						■		Sítio Ipu								■
Fazenda Inveja							Fazenda Floresta						■		Fazenda Boa Vista								■
Sítio Cascatinha							Fazenda Serrote						■		Fazenda Catingueira								■
Vila Maravilha							Fazenda Baluarte						■		Sítio Logo Tem								■
Sítio Maravilha							Sítio Favone						■		Fazenda Açude Novo								■
Sítio Riacho do Mulato		■	■			■	Sítio 1° de Maio								Ass. Apanha Peixe de Fora								■
Sítio Malhada da Areia							Fazenda Pedras								Sítio Forte do Mato								■
Sítio Jatobazinho							Fazenda Guanabara						■		Fazenda Fortuna								■
Sítio Guardado		■					Fazenda Várzea da Pitombeira						■		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Preto: anos com busca ativa e registro de triatomíneos; Cinza: anos com busca ativa sem registro de triatomíneos; Branco: anos sem busca ativa; Ass: Assentamento

Na **tabela 6** podemos visualizar que o número de localidades investigadas em 2016 (n = 4) reduziu quando comparada aos outros anos, e que o número de UDs positivas não tem sido igual ao número de UDs borrifadas. Nos anos de 2013, 2014 e 2016 as UDs não foram borrifadas, mesmo com a ocorrência de ninfas no intradomicílio.

Tabela 6 - Localidades investigadas, unidades domiciliares existentes, pesquisadas, positivas e borrifadas no município de Caraúbas/RN no período de 2010-2016.

Caraúbas	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Nº de localidades investigadas	18	35	28	14	19	45	4
Nº de localidades positivas	8	13	15	7	10	25	4
Nº de UDs existentes	355	804	254	238	731	598	120
Nº de UDs pesquisadas	298	502	190	155	440	368	60
Nº de UDs positivas	12	20	22	8	15	42	4
Nº de UDs com ninfas no intradomicílio	2	1	3	2	2	3	2
Nº de UDs com ninfas no peridomicílio	6	11	8	4	5	15	2
Nº de UDs borrifadas	9	20	16	0	0	33	0

Nº: número; UDs: unidades domiciliares.

O índice de infestação nas UDs variou ao longo dos anos e foi mais elevado nos anos de 2012 (11,6%) e 2015 (11,5%). Os índices de colonização intradomiciliar e peridomiciliar foram elevados em todos os anos, sendo ambos 100% no ano de 2016. Contudo, no período não houve registro de espécimes infectados por tripanossomatídeos (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Indicadores entomológicos observados no município de Caraúbas/RN no período de 2010-2016.

Indicadores entomológicos	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Índice de infestação (%)	4,0	4,0	11,6	5,1	3,5	11,5	6,7
Índice de colonização intradomiciliar (%)	66,7	50,0	37,5	100,0	28,6	42,9	100
Índice de colonização peridomiciliar (%)	75	64,8	57,1	66,7	62,5	42,9	100
Índice de infecção por tripanossomatídeos (%)	0	0	0	0	0	0	0

Um total de 565 espécimes de triatomíneos foi registrado nas UDs do município de Caraúbas, sendo 55,8% (315/565) *T. pseudomaculata*, 43,2% (244/565) *T. brasiliensis*, 0,7% (4/565) *P. megistus* e 0,3% (2/565) *P. lutzi*. A colonização do intradomicílio e do peridomicílio foi constatada pela presença de ninfas de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*. A ocorrência de *P. megistus* e *P. lutzi* foi raramente registrada nas UDs, onde foram encontrados apenas exemplares adultos (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Espécies de triatomíneos por estágio, capturadas nos ecótopos artificiais do município de Caraúbas/RN, no período de 2010 a 2016.

Espécie	Intradomicílio				Peridomicílio				Total	
	A	N	T	%	A	N	T	%	n°	%
<i>T. brasiliensis</i>	46	26	72	80,0	97	75	172	36,2	244	43,2
<i>T. pseudomaculata</i>	6	11	17	18,9	104	194	298	62,7	315	55,8
<i>P. megistus</i>	1	0	1	1,1	3	0	3	0,6	4	0,7
<i>P. lutzii</i>	0	0	0	0	2	0	2	0,5	2	0,3
Total	53	37	90	15,9	206	269	475	84,1	565	100

A: adulto; N: ninfa; T: total de espécimes por ambiente

5.3 Capítulo 3: Avaliação dos aspectos ecológicos dos triatomíneos encontrados nos ambientes antrópico e silvestre e genotipagem dos isolados do *T. cruzi*

5.3.1 Infestação dos ecótopos artificiais e infecção natural por tripanossomatídeos

A infestação foi observada em 23,8% (49/206) dos ecótopos das UD's investigadas, sendo mais elevada no galinheiro (48,3%). Nesses ecótopos foram capturados 462 exemplares de triatomíneos e as espécies identificadas foram *T. pseudomaculata* (n = 239), *T. brasiliensis* (n = 220) e *P. lutzi* (n = 3). *T. pseudomaculata* foi capturado apenas no peridomicílio e *P. lutzi* no intradomicílio, enquanto *T. brasiliensis* foi encontrado em ambos os ambientes. No peridomicílio, *T. brasiliensis* foi encontrado principalmente em curral e galinheiro, onde a infecção pelo *T. cruzi* foi 37,5% e 12,2%, respectivamente, usando três métodos para a detecção (exame direto, PCR do *kDNA* e a PCR multiplex). Em relação ao *T. pseudomaculata*, a infestação foi observada apenas no galinheiro e o índice de infecção foi 8,4%. No intradomicílio, a infecção foi detectada apenas em *P. lutzi* (66,7%) (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Infestação dos ecótopos artificiais e infecção natural pelo *T. cruzi* em triatomíneos capturados em Caraúbas/RN, no período de 2010 a 2016.

Ecótopos	Ecótopos infestados (%)	Triatomíneos infectados pelo <i>T. cruzi</i> (%) (Espécimes infectados/total de examinados)		
		<i>T. brasiliensis</i>	<i>T. pseudomaculata</i>	<i>P. lutzi</i>
Peridomicílio				
Curral	31,2 (5/16)	37,5 (24/64)	0	0
Galinheiro	48,3 (29/60)	12,1 (13/107)	8,4 (20/239)	0
Chiqueiro	0 (0/2)	0	0	0
Pilhas de telhas	38,9 (7/18)	0,0 (0/43)	0	0
Intradomicílio				
	7,3 (8/110)	0,0 (0/6)	0	66,7 (2/3)
Total	23,8 (49/206)	16,8 (37/220)	8,4 (20/239)	66,7 (2/3)

5.3.2 Infestação dos ecótopos silvestres e infecção natural por tripanossomatídeos

Um total de 219 espécimes de triatomíneos foi capturado no ambiente silvestre (ESEC-Seridó) e as espécies identificadas foram *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. lutzi* e *P. tertius* (**Figura 11, Tabela 10**). Além destas espécies, exemplares de uma espécie de triatomíneo semelhante a *T. brasiliensis* e *T. petrocchia* também foi encontrada e denominada aqui de *Triatoma* sp.

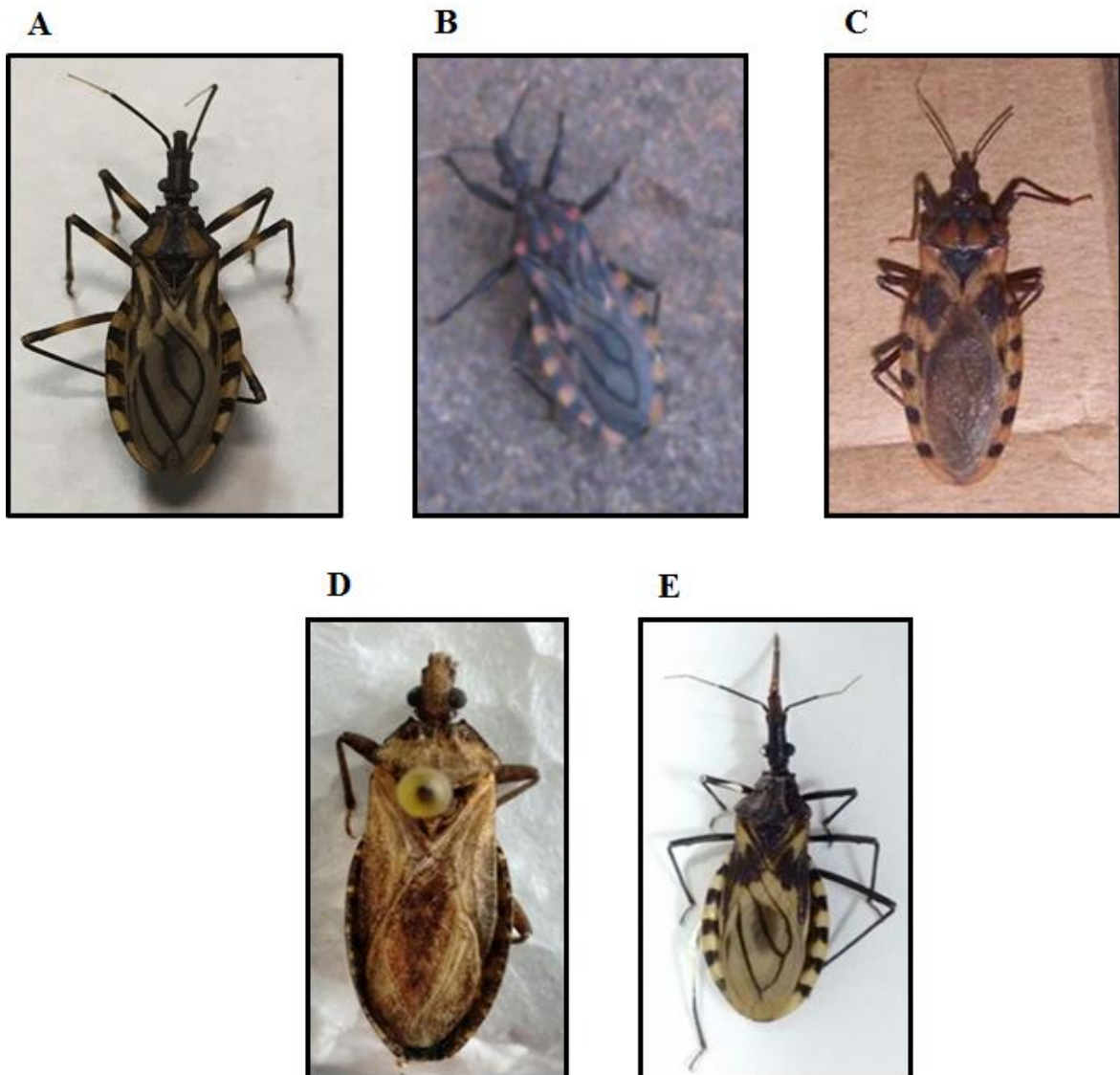


Figura 11 – Espécies de triatomíneos capturadas no ambiente silvestre (ESEC-Seridó). **A:** *T. brasiliensis*; **B:** *T. pseudomaculata*; **C:** *P. lutzi*; **D:** *P. tertius*; **E:** *Triatoma* sp.
Fonte: Acervo próprio

A maioria dos exemplares capturados foi da espécie *T. brasiliensis* (n = 150), seguida do *P. lutzi* (n = 54), *Triatoma* sp. (n = 9), *T. pseudomaculata* (n = 5) e *P. tertius* (n = 1). Ninfas e adultos de *T. brasiliensis* foram capturados em afloramentos de rochas, assim como alguns exemplares de *Triatoma* sp. Em relação a *T. pseudomaculata*, uma ninfa e um adulto foram coletados em tronco de árvores (*Anadenanthera colubrina*), conhecida como Angico. Um exemplar de *P. tertius* e alguns espécimes de *P. lutzi* e *T. pseudomaculata* foram coletados próximos ao alojamento da ESEC-Seridó, fora do seu ecótopo natural. O índice de infecção determinado pelo exame direto e/ou PCR do *kDNA* foi mais elevado em *P. lutzi* (64,8%), seguido do *T. pseudomaculata* (33,3%) e *T. brasiliensis* (4%) (**Tabela 10**). A PCR

multiplex confirmou a infecção pelo *T. cruzi* em 31 exemplares (seis *T. brasiliensis* e 25 *P. lutzii*) e detectou a presença do *T. rangeli* em um espécime de *P. lutzii* (dados não mostrados).

Tabela 10 - Número de espécies de triatomíneos por ecótopo, estágio evolutivo e percentual de infecção natural pelo *T. cruzi*.

Espécie de triatomíneos/Ecótopo	Adulto	Ninfa	Total	Triatomíneos infectados	
	n°	n°	n°	n°	%
Afloramentos de rochas					
<i>T. brasiliensis</i>	73	77	150	6	4,0
<i>Triatoma sp.</i>	9	0	9	0	0
Tronco de árvore*					
<i>T. pseudomaculata</i>	1	1	2	0	0
Alojamento da ESEC-Seridó**					
<i>T. pseudomaculata</i>	3	0	3	1	33,3
<i>P. lutzii</i>	54	0	54	35	64,8
<i>P. tertius</i>	1	0	1	-	-
Total	140	78	219	42	19

* Árvore identificada como (*Anadenanthera colubrina*); **Alojamento da ESEC-Seridó.

5.3.3 Fonte alimentar

Na padronização da fonte alimentar, todas as amostras utilizadas na identificação da fonte alimentar extraídas com *Kit* (n=15) e com fenol-clorofórmio (n=15) produziram sequências confiáveis, a maioria com identidade BLAST superior a 95%. Porém, em duas amostras extraídas com *Kit*, uma alimentada com *C. livia* e outra com *M. musculus*, a identidade das sequências foi inferior a 90% (**Quadro 2**).

Dos 111 triatomíneos capturados em ambiente antrópico, 92 apresentaram sequências confiáveis para a identificação de fonte alimentar. O *T. brasiliensis* foi mais eclético do que o *T. pseudomaculata*, tendo sete fontes alimentares identificadas em espécimes capturados no peridomicílio: *Bos indicus* (7,1%), *Canis familiaris* (7,1%), *Capra hircus* (10,7%), *Galea spixii* (10,7%), *G. gallus* (14,5%), *Homo sapiens* (42,9%) e *Ovis Áries* (7,1%). No intradomicílio, o sangue de *H. sapiens* foi identificado em 71,4% (5/7) dos exemplares (**Tabela 11**).

Quadro 2 – Identificação de fonte alimentar de triatomíneos alimentados em laboratório, identidade (Id) das sequências obtidas do conteúdo intestinal do vetor usando dois métodos diferentes de extração de DNA e código do *GeneBank*.

Alimentação fornecida/Amostras	[] _f do DNA (ng/μL)	Id (%)	Fonte alimentar	Código do GenBank	
<i>Columba livia</i> (Pombo doméstico)	P01K*	65,2	99	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P02K*	51,7	97	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P03K*	131,6	100	<i>Columba</i> sp.	KF926376.1
	P04K*	71,9	84	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P05K*	49,0	97	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P06F**	22,3	98	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P07F**	16,7	96	<i>Columba</i> sp.	KF926376.1
	P08F**	32,4	100	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P09F**	19,5	100	<i>Columba</i> sp.	KX902246.1
	P10F**	15,74	98	<i>Columba</i> sp.	KF926376.1
<i>Mus Musculus</i> (Camundongo)	C11K*	6,2	98	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
	C12K*	3,6	88	<i>Mus musculus</i>	KR020499.1
	C13K*	7,8	100	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
	C14K*	6,5	100	<i>Mus musculus</i>	KP168712.1
	C15K*	6,2	100	<i>Mus musculus</i>	KP168712.1
	C16F**	25,1	100	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
	C17F**	30,9	100	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
	C18F**	30,1	100	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
	C19F**	47,9	98	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
	C20F**	29,9	98	<i>Mus musculus</i>	KX381752.1
<i>Gallus gallus</i> (Galinha)	G21K*	76,5	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G22K*	90,6	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G23K*	36,9	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G24K*	98,9	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G25K*	65,3	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G26F**	69,1	100	<i>Gallus gallus</i>	AJ849444.2
	G27F**	69,5	97	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G28F**	193,75	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G29F**	88,9	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1
	G30F**	76,9	100	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1

*Extração de DNA com Kit; ** Extração de DNA com Fenol-Clorofórmio.

Tabela 11 - Fonte alimentar de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* capturados nos ecótopos artificiais do município de Caraúbas/RN.

Fonte alimentar	<i>T. brasiliensis</i>		<i>T. pseudomaculata</i>	
	n°	%	n°	%
Peridomicílio				
<i>Bos indicus</i>	2	7,1	0	0
<i>Canis lupus familiaris</i>	2	7,1	0	0
<i>Capra hircus</i>	3	10,7	0	0
<i>Galea spixii</i>	3	10,7	0	0
<i>Gallus gallus</i>	4	14,4	51	89,4
<i>Homo sapiens</i>	12	42,9	4	7,0
<i>Numida meleagris</i>	0	0	1	1,8
<i>Ovis aries</i>	2	7,1	0	0
<i>Tupinambus teguxin</i>	0	0	1	1,8
Total	28	100	57	100
Intradomicílio				
<i>Galea spixii</i>	1	14,3	0	0
<i>Homo sapiens</i>	5	71,4	0	0
<i>Mus musculus</i>	1	14,3	0	0
Total	7	100	0	0

No peridomicílio, o tipo de fonte alimentar variou de acordo com o ecótopo. O sangue de *H. sapiens* foi detectado na maioria dos exemplares de *T. brasiliensis* capturados no galinheiro (36,4%) e no curral (61,5%). No galinheiro, insetos alimentados com *G. gallus* (27,3%), *C. hircus* (18,2%), *B. indicus* (9,1%) e *G. spixii* (9,1%) também foram observados. Já no curral, a principal fonte alimentar de *T. brasiliensis* foi *H. sapiens* (61,5%), seguido de *O. aries* (15,4%) e *C. familiaris* (15,4%) (**Figura 12A**). Em relação ao *T. pseudomaculata*, as fontes alimentares detectadas no galinheiro foram *G. gallus*, *H. sapiens*, *Numida meleagris* e *Tupinambus teguxin*, sendo a primeira predominante, correspondendo a 89,4% (51/57) dos exemplares investigados (**Figura 12B**).

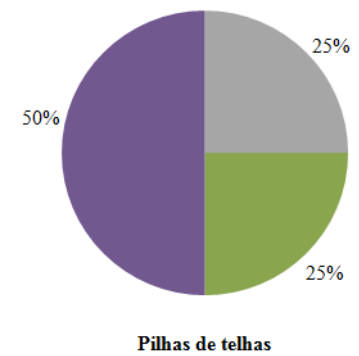
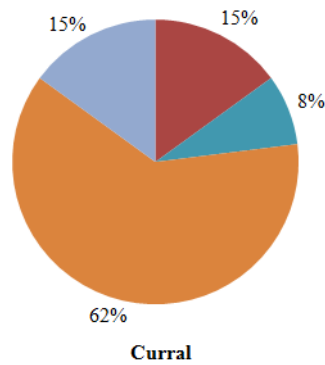
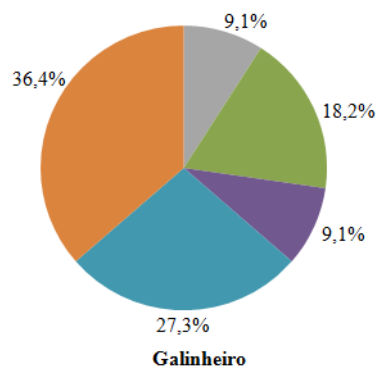
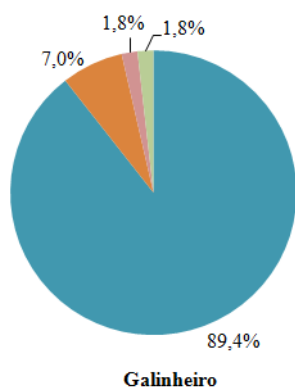
A. T. brasiliensis*A. T. pseudomaculata*

Figura 12 - Distribuição das fontes alimentares das espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* identificadas em diferentes ecótopos peridomiciliares do município de Caraúbas/RN. **A:** *T. brasiliensis*; **B:** *T. pseudomaculata*.

Dos insetos infectados pelo *T. cruzi* capturados no peridomicílio, a fonte alimentar foi identificada em 25, dos quais 52% estavam alimentados com sangue de *H. sapiens*. O sangue de *C. familiaris*, *C. hircus*, *G. spixii*, *G. gallus* e *O. aries* também foi detectado nos espécimes infectados (**Figura 13**). Em dois desses espécimes (um *T. brasiliensis* e um *T. pseudomaculata*) alimentados com *H. sapiens*.

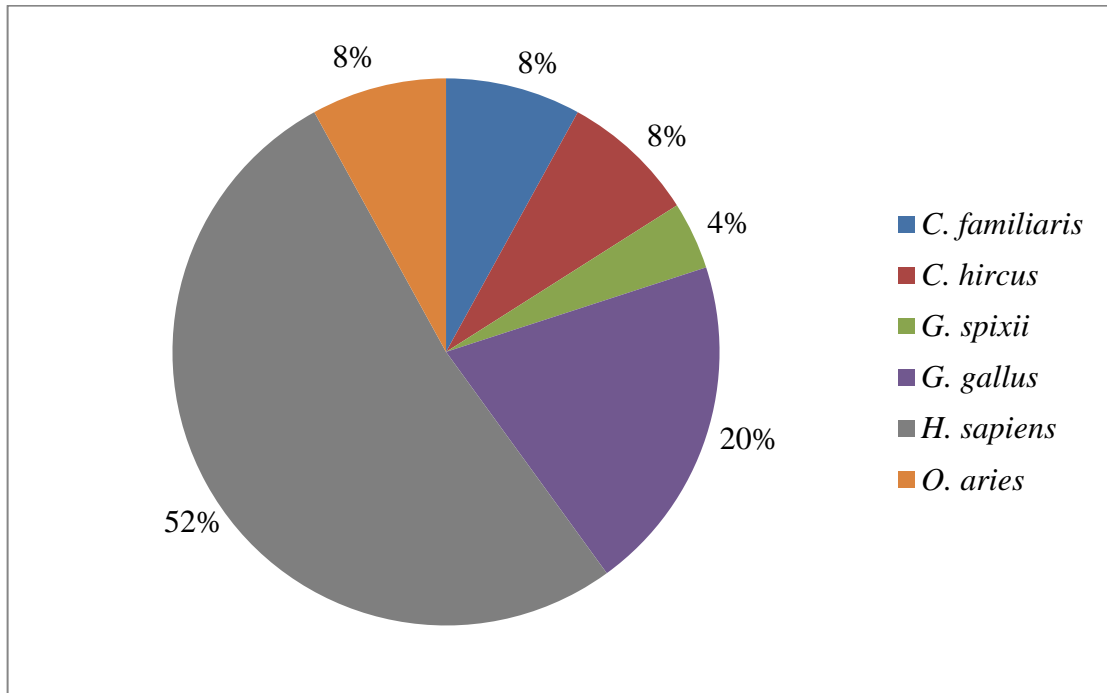


Figura 13 - Fontes de alimentação identificadas nos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* encontrados no ambiente peridomiciliar do município de Caraúbas/RN.

No ambiente silvestre, a fonte alimentar de *T. brasiliensis* foi identificada em apenas 20 exemplares. A maioria em roedores das espécies *T. apereoides* (30%) e *G. spixii* (30%). Em 25% dos espécimes o DNA identificado foi de *H. sapiens*, 10% de *C. hircus* e 5% de *M. musculus* (**Figura 14**).

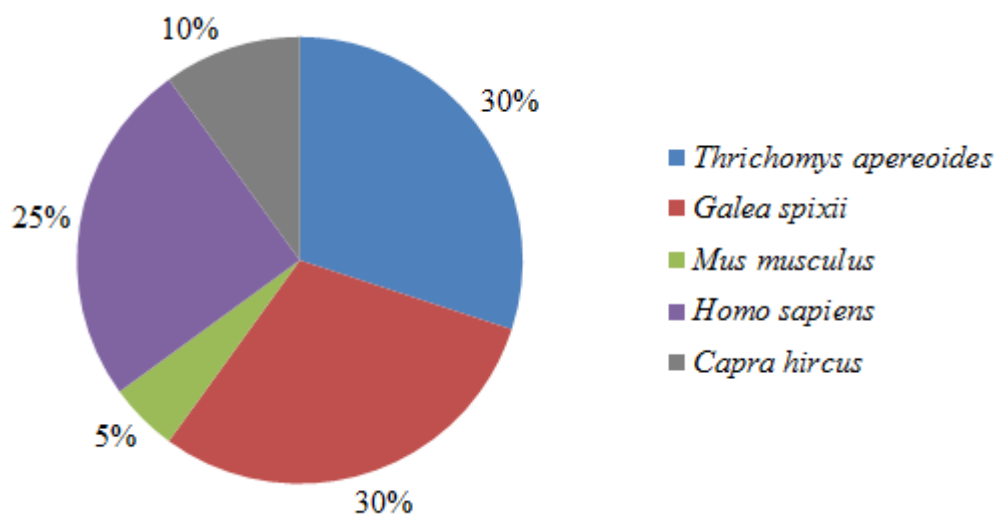


Figura 14 - Fonte alimentar de *T. brasiliensis* capturados em afloramentos de rochas na ESEC-Seridó, no município de Serra Negra do Norte/RN.

5.3.4 Genotipagem do *T. cruzi* isolado de triatomíneos capturados em ecótopos artificiais e silvestres

Os resultados referentes à caracterização genética dos isolados do *T. cruzi* obtidos de triatomíneos dos ecótopos artificiais e naturais foram reunidos em forma de artigo científico publicado em 2016 na *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* sob o título “*Characteristics of triatomine infestation and natural Trypanosoma cruzi infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil*” (**Anexo 8**).

5.4 Capítulo 4: Análise morfológica e taxonômica de *Triatoma* sp.

A maioria dos caracteres do *Triatoma* sp. foi semelhante ao *T. petrocchiae* e distinto do *T. brasiliensis*. Porém, o *Triatoma* sp. possui alguma semelhança com o *T. brasiliensis* por apresentar manchas amarelas visíveis na lateral do pescoço, coloração marrom escuro e o processo posterior do escutelo arredondado e levemente levantado. Em alguns espécimes de *Triatoma* sp. o pronoto é preto, diferentemente do que foi observado em *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae* (Tabela 12).

Tabela 12 – Número de espécimes e descrição dos caracteres morfológicos das espécies *T. brasiliensis*, *T. petrocchiae* e *Triatoma* sp.

Caracteres	Descrição dos caracteres	Tb	Tp	Tsp.
Cabeça	Um pouco mais longa que o pronoto	36	0	0
	Muito mais longa que o pronoto	0	1	6
Inserção do tubérculo antenífero	Na metade da região antecular	36	0	0
	Ligeiramente adiante da metade da região antecular	0	1	6
1° artículo antenal	Atinge o nível do ápice do clipeo	36	0	0
	Curto	0	1	6
Rostro	Grosso com cerdas no primeiro segmento	36	0	0
	Estreito e glabro	0	1	6
Pescoço	Com mancha amarela visível na lateral	36	0	2
	Com mancha sutil na lateral	0	1	4
Pronoto	Marrom escuro	36	1	2
	Preto	0	0	4
	Manchas amarelas nas carenas e áreas adjacentes	36	0	0
	Mancha sutil nas carenas	1	0	6
Processo posterior do escutelo	Processo posterior arredondado e horizontal	0	1	0
	Processo posterior com ápice arredondado e levantado	36	0	6
Pernas	Uniformemente escuras	0	1	6
	Com anelacão clara nos fêmures	36	0	0

Tb: *T. brasiliensis*; Tp: *T. petrocchiae*; Tsp.: *Triatoma* sp.

O fenograma obtido a partir dos caracteres morfológicos mostra a formação de dois grupos principais. No primeiro grupo está incluído a espécie *T. petrocchiae* e todos os espécimes que chamamos de *Triatoma* sp., e no segundo grupo estão todos os exemplares da espécie *T. brasiliensis* (Figura 15).

Na análise taxonômica utilizando o marcador mitocondrial *Cyt b* foi avaliado um total de 358 nucleotídeos presentes em todas as amostras formando quatro clados. Os sete espécimes de *Triatoma* sp. formaram um clado monofilético entre *T. sordida* e *T. petrocchiae* na árvore filogenética. Em relação às espécies do complexo *T. brasiliensis*, um clado foi formado

contendo somente exemplares de *T. melanica* e o outro agrupou os exemplares de *T. brasiliensis* desse estudo, juntamente com as sequências depositadas no *GeneBank* de *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma* e *T. juazeirensis* (**Figura 16**).

Na análise com o marcador nuclear ITS-1, *Triatoma* sp. formou um clado com o *T. petrocchiaae*. Os exemplares de *T. brasiliensis* isolados formaram um clado com exemplares de espécies do complexo *T. brasiliensis* (*T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma* e *T. juazeirensis*) depositadas no *GeneBank*. *T. melânica* formou um clado independente das outras espécies do complexo *T. brasiliensis*. (**Figura 17**).

As árvores filogenéticas do *Cyt b* e do ITS-1 não foram comparadas devido ao número diferente de táxons apresentados.

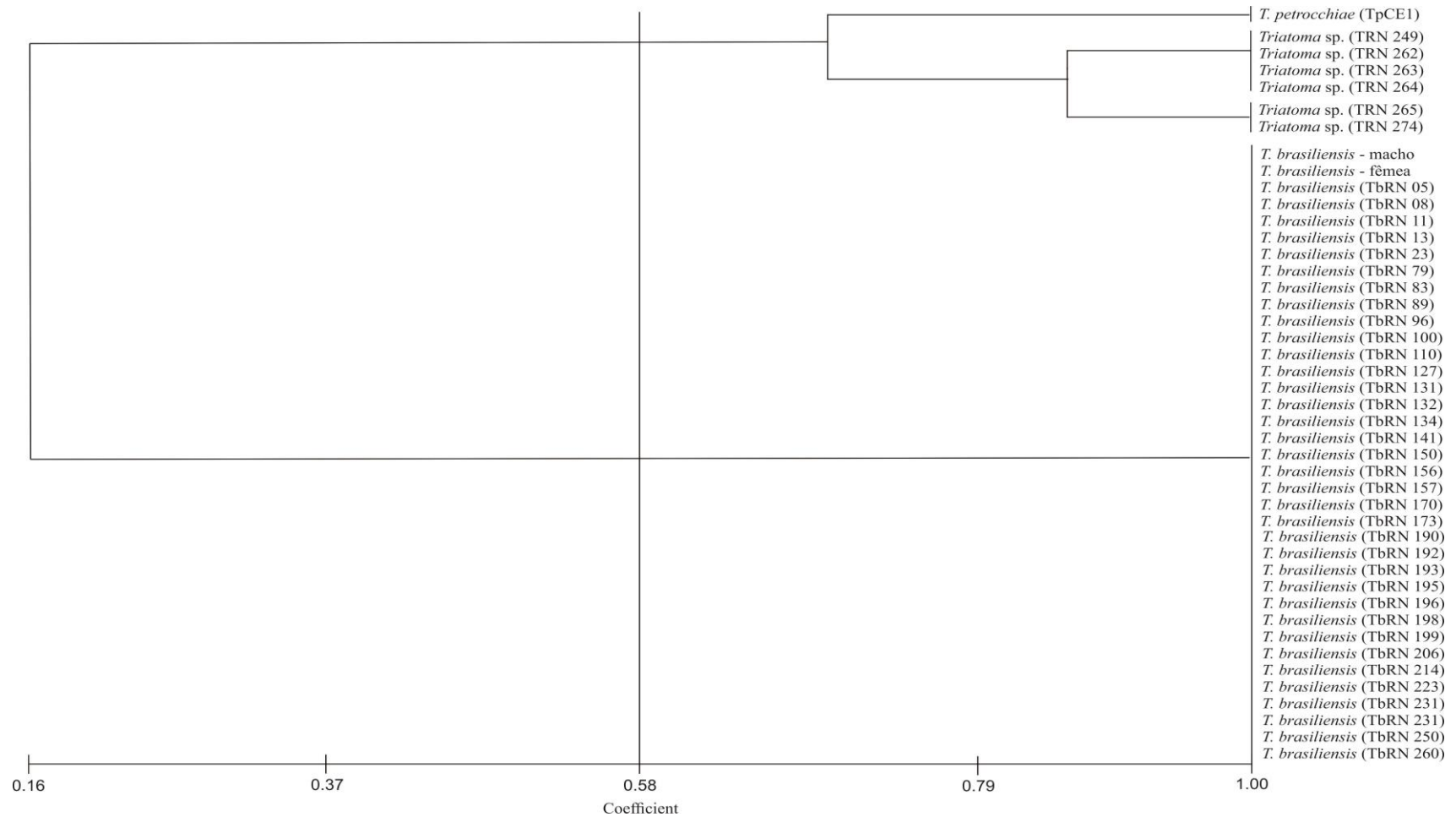


Figura 15 - Fenograma construído a partir da matriz de presença e ausência de caracteres morfológicos utilizando o coeficiente de associação de Dice.

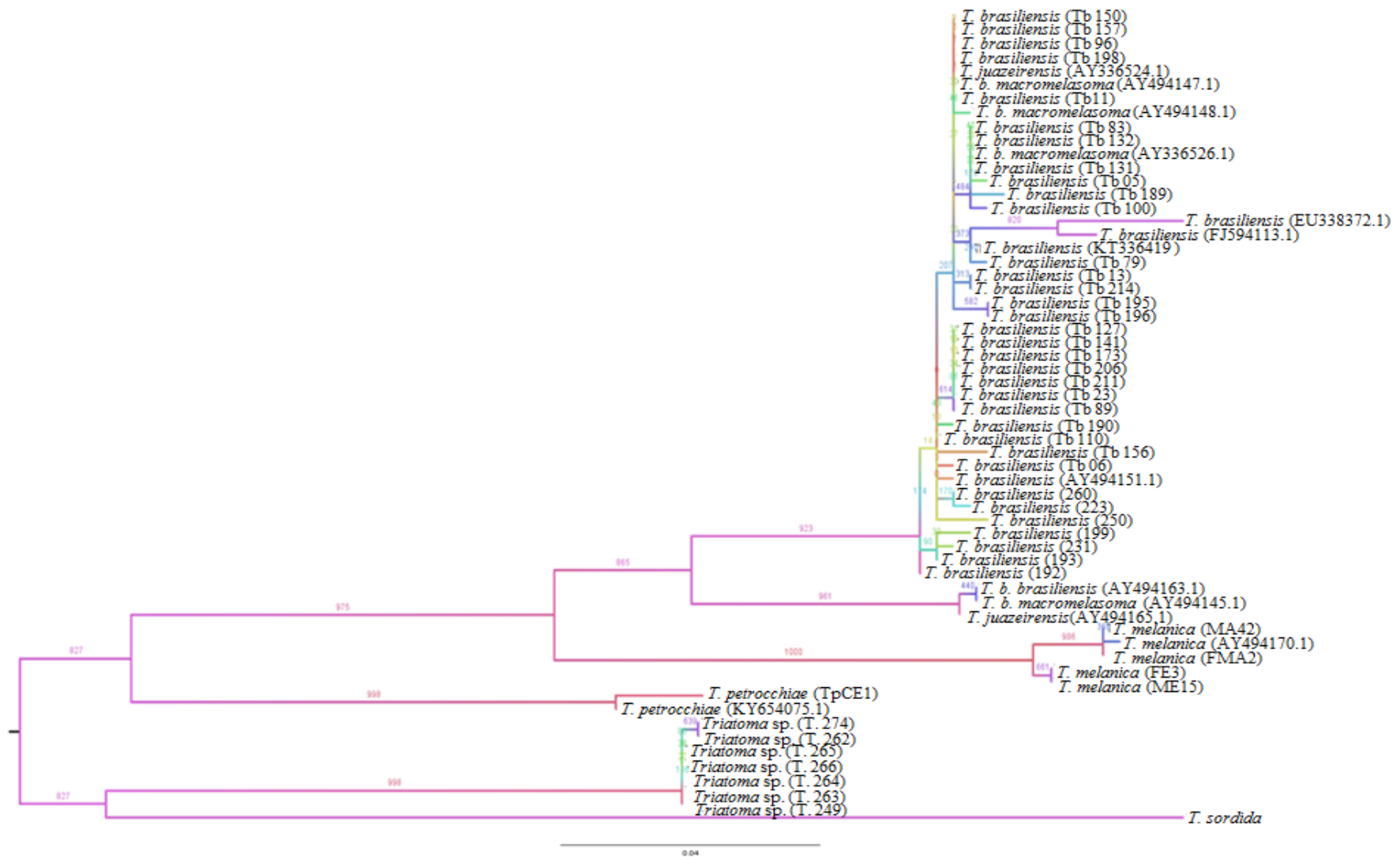


Figura 16 - Árvore de Máxima Verossimilhança obtida com base no gene *Cyt b* para mostrar a relação genética entre *Triatoma* sp., *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae* capturados no Rio Grande do Norte, juntamente com as amostras depositadas no *GeneBank*. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de *bootstraps* para 1000 replicas.

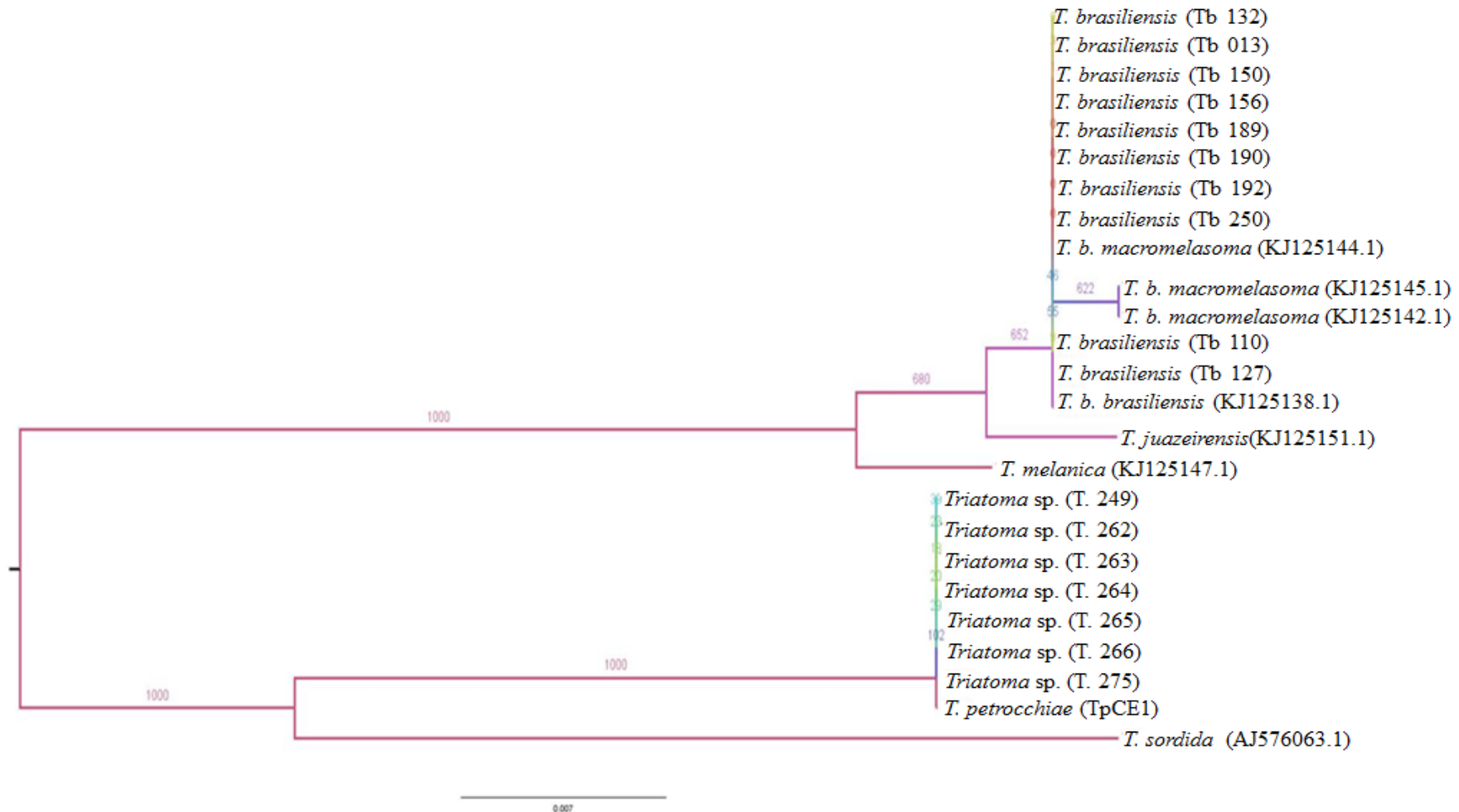


Figura 17 - Árvore de Máxima Verossimilhança obtida com base no marcador ITS-1 para mostrar a relação genética entre *Triatoma* sp., *T. brasiliensis* e *T. petrocchiai* capturados no Rio Grande do Norte, juntamente com as amostras depositadas no *GeneBank*. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de *bootstraps* para 1000 replicas.

6 DISCUSSÃO

No estado do RN, dos 167 municípios 113 estão realizando a busca ativa de triatomíneos nas UDs, porém, a maioria de forma descontínua. A busca ativa foi mais frequente nos municípios de alto e médio risco para a transmissão do parasito. Essa diferença na frequência da VE ocorre devido aos ajustes dessas atividades com base nos riscos estabelecidos (SILVEIRA, 2011; SILVEIRA & DIAS, 2011), o que explica a descontinuidade ou a não realização das ações de controle nos municípios de baixo risco no estado. Desse modo, podemos inferir que as atividades de vigilância entomológica referentes a busca ativa e controle vetorial do sistema são mais fracas nos municípios considerados de baixo risco e a ausência dessa atividade na maioria desses municípios gera menos registros para a SESAP/RN, dando a impressão de que não há triatomíneos nas UDs e, supostamente, que a transmissão não ocorre. Portanto, a transmissão do *T. cruzi* pelo vetor nesses municípios fica negligenciada até que a situação de pré-controle seja restaurada, gerando uma falsa impressão de segurança. De acordo com SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA (2006) trata-se de um fenômeno denominado "punição do sucesso", o qual os graves efeitos infelizmente estão bem documentados (GURTLER et al., 2007).

A estratificação do RN e da maioria dos estados do Brasil foi baseada num cenário ecoepidemiológico caracterizado por uma área endêmica com transmissão vetorial domiciliar registrada, e cujo risco de transmitir o *T. cruzi* está limitado à transmissão focal por espécies nativas (SILVEIRA & DIAS, 2011). A estratificação de risco de transmissão do *T. cruzi* associado à transmissão vetorial tem contribuído para a orientação e sustentação das ações de controle, sendo incorporada pelos programas de controle de estados e municípios de várias regiões do país (COURA & DIAS, 2009; SILVEIRA & DIAS, 2011; SILVEIRA, 2011).

Nossos dados mostraram que a cada ano o número de municípios que executa as atividades de VE está diminuindo e, conseqüentemente, o número de UDs investigadas. Contudo, o número de UDs positivas vem aumentando e a presença de ninfas no intradomicílio tem sido registrada anualmente. Estes resultados demonstram a negligência das questões político-administrativas relativas aos programas de controle sistemático, que podem estar relacionadas com os baixos níveis de transmissão do *T. cruzi* no estado e a emergência de outras doenças (Dengue, Zika, Chikungunya e Leishmaniose visceral canina). A responsabilidade de manter e sustentar as ações de controle das endemias é de cada município que deve dispor da cooperação das autoridades (PAULA et al., 2010). Abad-Franch et al. (2013) sugeriram um debate entre a OPAS/OMS, os funcionários responsáveis pela saúde

pública e a comunidade científica, com a finalidade de definir melhores formas de monitoramento do desempenho dos programas de controle.

Na avaliação das ações de controle químico deste estudo ficou demonstrado que o número de UDs borrifadas tem sido sempre menor do que o de UDs positivas ao longo dos anos. No que diz respeito ao município de Caraúbas, dos seis anos avaliados, as ações de controle químico não foram realizadas por três anos, mesmo com o registro de ninfas no intradomicílio e no peridomicílio. Sabe-se que as atividades de controle vetorial em áreas rurais são severamente prejudicadas por restrições econômicas e políticas, resultando na realização esporádica do controle químico das UDs, o que contribui para o aumento das taxas de reinfestação pelos triatomíneos (GURTLE et al., 2007; GURTLE, 2009). Ademais, quando a VE ocorre de forma inadequada, os vetores nativos podem reinadir e colonizar as casas humanas, contribuindo para a possibilidade de novos casos de transmissão do *T. cruzi* (GURTLE et al., 2007). SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA (2006) enfatizaram que, mesmo com um funcionamento adequado do programa de controle, a transmissão desse parasito para os humanos sempre ocorrerá, o que torna impossível a erradicação da infecção/doença devido o seu caráter zoonótico.

Contudo, para alcançar níveis significativos de controle vetorial em áreas endêmicas, como é o caso RN, Gurtler (2009) enfatiza que as ações de controle precisam ser sustentadas ao longo do tempo. Assim, Caraúbas e outros municípios podem estar enfrentando dificuldades no que diz respeito à execução das ações de controle, que muitas vezes podem estar relacionadas com à extensa área rural, o baixo número de agentes de endemias que desempenham essa função, o remanejamento destes para o controle de outras endemias e a escassez de recursos. De acordo com Gurtler (2009), os programas de controle vetorial estão mal equipados para lidar com essas tarefas recorrentes, especialmente em áreas rurais, onde os recursos são limitados e as populações humanas são de difícil acesso em virtude da baixa densidade e dispersão, resultando em altos custos operacionais.

O aumento dos índices de infestação intradomiciliar e peridomiciliar e o elevado índice de colonização que persiste no estado indicam que o risco de transmissão vetorial ainda existe. Estes dados estão diretamente relacionados com o aumento do número de triatomíneos capturados ao longo dos anos. Prata (1981) demonstrou que a persistência das endemias está diretamente relacionada com a irregularidade das atividades de VE que ocorrem por motivos de ordem administrativa e orçamentária. O processo de descentralização das endemias no Brasil não ocorreu de forma gradativa, não havendo uma preparação adequada no repasse das responsabilidades de vigilância epidemiológica para os municípios (CERQUEIRA et al.,

2003). Essa situação é preocupante, principalmente em áreas onde o *T. brasiliensis* e o *T. pseudomaculata* estão presentes no intradomicílio, como é o caso do RN, pois, dependendo da situação do município, pode não haver intervenção.

Durante os 11 anos estudados, as espécies *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchiae*, *P. lutzi*, *P. megistus* e *R. nasutus* foram registradas nas UDs do RN. Essas espécies têm sido encontradas em ecótopos artificiais desse estado desde a década de 1950 até os dias atuais (LUCENA, 1959; CASTRO-FILHO & SILVEIRA, 1979; SILVEIRA & VINHAES, 1998; COSTA et al., 2003a; CÂMARA et al., 2010; SILVEIRA, 2011; BARBOSA-SILVA, 2013; LILIOSO et al., 2017). A presença dessas espécies também foi registrada em UDs no Piauí (GURGEL-GONÇALVES et al., 2010), Ceará (SARQUIS et al., 2012), Pernambuco (SILVA et al., 2012, 2015) e Paraíba (OLIVEIRA et al., 2016; LILIOSO et al., 2017).

Neste estudo, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* foram os vetores mais frequentes nas UDs, com ampla distribuição no estado. Essas espécies são facilmente encontradas infestando e colonizando o intradomicílio e o peridomicílio, muitas vezes com elevados índices de infecção natural pelo *T. cruzi* (COSTA et al., 2003a; SARQUIS et al., 2004). Estudos realizados no RN (BARBOSA-SILVA, 2013), Ceará (SARQUIS et al., 2004, 2006, 2012) e Pernambuco (SILVA et al., 2012, 2015) mostraram a predominância dessas espécies no peridomicílio, corroborando os nossos dados. *T. brasiliensis* continua se destacando no RN como o principal vetor do *T. cruzi*, conforme relatado por Lucena (1959), sendo uma espécie constante no intradomicílio e a mais capturada no peridomicílio nos últimos anos. A segunda espécie mais registrada nas UDs foi a *T. pseudomaculata*, encontrada principalmente no peridomicílio, porém, com um número elevado de exemplares capturados no intradomicílio. Esses dados sugerem que *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* estão bem adaptados aos ambientes antrópicos no estado e isto deve ser levado em consideração no planejamento das estratégias de controle vetorial. Uma estratégia que pode funcionar como uma barreira de entrada dessas espécies no intradomicílio é certificar-se de que o peridomicílio tenha uma baixa taxa de infestação (DIAS-LIMA & SHERLOCK, 2000; SILVEIRA et al., 2001).

A proximidade das UDs com o ambiente silvestre justifica a grande quantidade de *T. brasiliensis* capturada nos ecótopos artificiais mesmo havendo o controle químico. Essa proximidade entre os ambientes domiciliar, peridomiciliar e silvestre foi recentemente observada em áreas rurais do estado (BARBOSA-SILVA, 2013). A persistência da infestação por esta espécie nas UDs, mesmo após o tratamento químico tradicional, é decorrente da densidade dessa espécie na natureza, aliado ao fato de que a habitação humana é de certa

forma, dentro ou muito perto do ambiente silvestre (SILVEIRA et al., 2001). Diotaiuti et al. (2000) demonstraram a reinfestação de ecótopos artificiais (9,7%) no Ceará quatro meses após o tratamento com deltametrina. Além disso, as atividades humanas também desempenham um papel importante na infestação domiciliar e o modo de vida dos indivíduos que vivem em áreas rurais (origem, idade, aposentadoria e o modo de gerenciar os anexos peridomiciliares) (WALTER et al., 2005).

No ambiente silvestre, *T. brasiliensis* foi encontrado em afloramentos de rochas, que são típicos no bioma de Caatinga, associados a roedores, marsupiais ou morcegos (ALENCAR, 1987, BEZERRA et al., 2014), e mais recentemente foi relatada a sua associação com o cacto da espécie *Pilosocereus gounellei* (VALENÇA-BARBOSA et al., 2014). Essa espécie possui habilidade de se adaptar aos ecótopos distintos e atuar como elo entre os ciclos de transmissão silvestre, peridomiciliar e domiciliar do *T. cruzi* (BORGES et al., 2005). Esta adaptação aos diferentes ambientes, tanto o antrópico quanto o natural, destaca a importância em se conhecer melhor os aspectos biológicos e ecológicos dessa espécie, contribuindo para a implementação da VE e estratégias de controle (SARQUIS et al., 2004; 2006; 2010; 2012)

A espécie *T. pseudomaculata* foi encontrada em casca de árvores secas da espécie *Anadenanthera columbrina* (Angico) em seu habitat natural, corroborando os dados de Carbajal-de-la-Fuente et al. (2008). Essa árvore pertencente à família Mimosaceae é comumente encontrada no ambiente silvestre (ESEC-Seridó). Esta espécie de triatomíneo é arbórea, cujo principal habitat consiste em troncos de árvores, onde costuma abrigar-se em ocos e sob a casca de árvores secas (FREITAS et al., 2005). O *T. pseudomaculata* ainda pode ser encontrado em outras espécies de árvores, tais como *Mimosa tenuiflora* (Jurema Preta), *Caesalpinia pyramidalis* (Catingueira), *Spondias tuberosa* (Umbuzeiro), *Commiphora leptophloeos* (Imburana), *Schinopsis brasiliensis* (Barauna), *Sideroxylon obtusifolium* (Quixabeira), *Lithraea molleoides* (Aroeira), *Aspidosperma pyriforme* (Pereiro) e *Cnidoscolus quercifolius* (Faveleira). Além de árvores, *T. pseudomaculata* também foi encontrado em outros ecótopos no ambiente silvestre como ninho de pássaros (CARBAJAL-DE-LA-FUENTE et al., 2008; BARBOSA-SILVA, 2013).

Nos dados secundários da SESAP/RN referentes a busca ativa de triatomíneos também foi verificado que *R. nasutus* e *P. lutzii* apresentam ampla distribuição no estado do RN, onde foram registrados nas UD's da maioria dos municípios. A presença de *R. nasutus* pode ser justificada pela proximidade entre palmeiras de carnaúba (*Copernicia prunifera*) e as UD's, fato que deve ser considerado no que diz respeito ao processo de domiciliação. Esse vetor

pode invadir o intradomicílio atraído pela luz ou a procura de alimento (SARQUIS, et al., 2004). Outro fator é o uso dos troncos da palmeira de carnaúba na construção de anexos peridomiciliares, cujos espécimes são transportados passivamente do seu habitat natural para as UD's (DIAS, 2000; SARQUIS et al., 2004, 2006). No RN, focos de colonização por *R. nasutus* foram observados no peridomicílio em palha de carnauba seca, usada pela população rural para a fabricação de artigos domésticos no município de Apodi (BARBOSA-SILVA, 2013).

Em relação ao *P. lutzi*, trata-se de uma espécie de triatomíneo nativa que merece atenção pela frequência com que tem sido registrada nas UD's nos últimos anos e pela sua tendência de constituir colônias no intradomicílio (SILVEIRA & MARTINS, 2014). Em Caraúbas, espécimes adultos de *P. lutzi* foram encontrados no intradomicílio e no peridomicílio. Esse vetor geralmente é atraído pela luz das UD's e a ausência de tetos, janelas e telas nas mesmas fornece as melhores condições para invasão (CARANHA et al., 2006; LOROSA et al., 2008). Dias-Lima et al. (2003) relacionam às invasões desses insetos as habitações humanas a caça intensiva do tatu, provocando o desaparecimento da sua fonte alimentar e conseqüentemente do seu habitat natural estável.

No ambiente silvestre, vários exemplares de *P. lutzi* foram coletados próximos ao alojamento da ESEC-Seridó fora dos seus ecótopos naturais, os quais são desconhecidos na área até o momento. Entretanto, no estado da Bahia, Dias-Lima et al. (2003) encontraram ninfas de *P. lutzi* em tocas de tatus, demonstrando que esse ecótopo constitui um local de reprodução para esta espécie. Essa espécie também foi observada em troncos ocos de pau branco (*Auxemma oncocalyx*) (GARCIA et al., 2005), em pedras habitadas por *Kerodon rupestris* (mocó) e sob a casca de *Auxemma oncocalyx* (Allemao) (DIAS-LIMA et al., 2003; SOUZA et al., 2003).

Outra espécie encontrada próxima ao alojamento da ESEC-Seridó foi *P. tertius*, sendo este o primeiro relato da ocorrência dessa espécie no estado do RN, ampliando a sua área de distribuição. Dados anteriores demonstraram que essa espécie foi registrada em outros estados das regiões Nordeste do Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Piauí), Norte (Pará, Tocantins), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), onde ocorre em ambiente silvestre, em ninhos de árvores da família Funariidae e Mimidae e sob a casca de *Artocarpus heterophyllus* (Moraceae) (LENT & WYGODZINSKY, 1979; SILVEIRA, FETIOSA & BORGES, 1984; GALVÃO et al. 2014). O encontro de um único espécime de *P. tertius* pode ser justificado pela sua baixa densidade populacional nos ecótopos, que depende da estação do ano e da ocupação do ninho

(ESPÍNOLA, 1985). A ocupação dos ninhos está relacionada com o mecanismo de dispersão de *P. tertius*, que pode ser transportado passivamente com ovos aderidos às penas das aves (SCHOFIELD, 1994). Esse exemplar foi capturado após um desmatamento de *Prosopis juliflora* (algaroba) na ESEC-Seridó, para a remoção de espécies de plantas introduzidas ao local. Essa espécie vegetal, pertencente à família Fabaceae e subfamília Mimosodae foi introduzida no RN em 1946, a partir de sementes oriundas do Peru (MENDES, 1987), com a finalidade de aumentar os recursos naturais das áreas do semiárido, servindo de alimento para os animais e como alternativa de reflorestamento de áreas desmatadas da Caatinga (MENDES, 1989).

No período avaliado, a presença de *T. petrocchia* e *P. megistus* foi pouco registrada nas UDs dos municípios do RN, apresentando também uma distribuição territorial mais restrita. *T. petrocchia* foi encontrado em alguns municípios das mesorregiões Oeste e Central. Trata-se de uma espécie silvestre, limitada apenas à região Nordeste do Brasil, tendo sido registrado nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO et al., 2003; CARANHA et al., 2011). Em relação ao *P. megistus*, a ocorrência foi restrita a cinco municípios da mesorregião Oeste do estado, dos quais dois fazem parte da microrregião da Chapada do Apodi (Apodi e Caraúbas), área onde ainda observa-se resquícios de Mata Atlântica. É sabido que essa espécie é amplamente distribuída no bioma de Mata Atlântica (FORATTINI, 1980), em áreas úmidas do Cerrado e na Caatinga, sendo importante do ponto de vista epidemiológico devido ao seu potencial para invadir e colonizar domicílios, apresentando elevados índices de infecção pelo *T. cruzi* (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

Nossos dados mostraram que *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchia*, *P. lutzi* e *R. nasutus* estão associadas ao intradomicílio e peridomicílio, onde a presença de ninfas comprovou a colonização desses ambientes por essas espécies. O encontro de ninfas no intradomicílio é um indício de colonização domiciliar, devido à incapacidade de voar desses insetos nesse estágio, indicando que tenham sido criados próximos aos seres humanos (FORATTINI et al., 1981; SARQUIS et al., 2004; VALENÇA-BARBOSA et al., 2015). Nós detectamos pela primeira vez a colonização intradomiciliar por *T. petrocchia*, *P. lutzi* e *R. nasutus* no RN. Em relação ao peridomicílio, registramos a primeira ocorrência de colonização deste ambiente pelo *P. lutzi*. Todavia, a realização de estudos relacionados ao habitat natural dessa espécie é necessária para compreender melhor o processo de infestação e colonização do ambiente antrópico por essa espécie. É possível que *P. lutzi* e *R. nasutus* estejam passando por um processo de domiciliação no estado. Segundo Aragão (1983), a

domiciliação está diretamente ligada à existência ou disponibilidade de um nicho ao qual a espécie já estaria adaptada e o ecletismo alimentar seria um dos principais pré-requisitos. O processo de domiciliação do *P. lutzi* ocorreu de forma mais acentuada no estado de Pernambuco, o que poderia ser devido à redução de populações de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* antes domiciliadas (SILVEIRA & DIAS, 2011). A proximidade do *P. lutzi* com os ecótopos artificiais é preocupante, pois essa espécie silvestre tem sido relatada com 66,7% de infecção natural pelo *T. cruzi* no intradomicílio do município de Caraúbas/RN (BARBOSA-SILVA, 2013). Esses dados indicam a necessidade de uma VE constante e de um controle químico mais regular, a fim de evitar o contato desse inseto com os humanos e animais domésticos, prevenindo assim a transmissão do parasito.

As medidas de controle mais eficientes devem ser adotadas a fim de eliminar a colonização das UD's por essas espécies, bem como evitar novos focos de triatomíneos oriundos do ambiente silvestre. Conforme mencionado por Silveira e Dias (2011), a única opção para o controle da transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi* no intradomicílio é impedir ou reduzir as oportunidades de contato entre o homem e o triatomíneo infectado, evitando a entrada do triatomíneo no domicílio e/ou eliminando as colônias existentes por meio do controle químico vetorial utilizando inseticidas de ação residual nas UD's. Em relação ao *T. brasiliensis*, tem sido sugerido o aumento da pressão inseticida acompanhada da VE, de modo a obter o controle efetivo e rápido sobre os novos focos, abrindo espaço para atividades educativas que contemplem a melhoria física e manejo dos ecótopos peridomiciliares, em especial, aqueles que comumente servem de abrigo para essa espécie (DIOTAIUTI et al., 2000). Outras espécies nativas, oriundas de diferentes biomas brasileiros, também têm sido encontradas colonizando ecótopos artificiais de vários estados das diferentes regiões do Brasil, como é o caso do *T. rubrovaria* no Sul (ALMEIDA et al., 2000; RAMOS et al., 2008; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012), *T. vitticeps* na região Sudeste (SANTOS et al., 2005) e *T. sordida* no Centro-Oeste (DIOTAIUTI et al., 1993).

A infestação por diferentes espécies de triatomíneos é decorrente dos estímulos de alimento e abrigo (FORATTINI, 1980). Nesse contexto, o peridomicílio oferece uma variedade de hospedeiros e abrigos, além de outras condições propícias ao desenvolvimento dos triatomíneos, os quais podem ser atraídos para um determinado ecótopo, dependendo da espécie (CECERE et al., 2004). Os dados mostraram que no peridomicílio o *T. brasiliensis* foi encontrado infestando galinheiro, curral e pilhas de telhas, e o *T. pseudomaculata* foi observado exclusivamente em galinheiro. Estudos realizados no Ceará também demonstraram a infestação desses ecótopos por *T. brasiliensis*, além de pilhas de tijolos e madeiras

(OLIVEIRA-LIMA et al., 2000; SARQUIS et al., 2006). Oliveira-Lima et al. (2000) demonstraram que os ecótopos mais colonizados eram abrigos de animais e as pilhas de telhas/tijolos/madeiras, corroborando em parte os nossos dados. O peridomicílio é o principal fator de infestação intradomiciliar em áreas ocupadas por *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* (OLIVEIRA FILHO et al., 2000). A destruição ou transformação dos ecótopos naturais podem provocar o desaparecimento dos animais que servem como fonte de alimentação para os triatomíneos, o que resulta na invasão desses insetos aos ambientes antrópicos em busca de abrigo e novas fontes alimentares como o homem e animais domésticos ou sinantrópicos (DIAS-LIMA & SHERLOCK, 2000). Walter et al. (2005) enfatizaram que a presença do gado é um fator que contribui para a infestação de triatomíneos nas UDs e sugerem uma avaliação das condições em que os animais são criados, o que irá contribuir para o controle dos triatomíneos.

No presente estudo, os dados relacionados à infecção foram os mais variados. De acordo com os dados da SESAP-RN, o índice de infecção natural por tripanossomatídeos foi 2,4%. O *T. brasiliensis* apresentou o índice de infecção mais elevado (3,2%), seguido do *R. nasutus* (1,7%), *T. pseudomaculata* (1,6%), *T. petrocchiae* (1,3%) e *P. lutzi* (0,7%). A presença de insetos infectados aliada ao aumento da infestação domiciliar, principalmente pelo *T. brasiliensis*, espécie com infecção mais elevada e encontrada no intradomicílio, é um alerta para a transmissão do *T. cruzi* e chamam a atenção para espécies silvestres que vêm adquirindo importância epidemiológica no estado, como o *P. lutzi* e o *R. nasutus*. Portanto, para evitar o contato dos humanos e animais domésticos com esses vetores, é necessário que as atividades de VE sejam executadas de forma contínua e que o controle vetorial seja sistemático para prevenir a transmissão domiciliar do *T. cruzi* no estado.

De acordo com os dados da SESAP/RN, nenhum exemplar de triatomíneo capturado nas UDs de Caraúbas apresentou infecção pelo *T. cruzi* usando o método clássico de detecção (exame direto). Por outro lado, de acordo com os dados primários, usando o exame direto e a PCR, os índices de infecção natural pelo *T. cruzi* foram elevados nas espécies de triatomíneos capturados em diferentes ecótopos. Esses resultados mostram a necessidade da utilização de métodos mais sensíveis para a detecção do *T. cruzi* nas URSAPs, que estão ligadas a SESAP/RN, com o intuito de revelar a situação epidemiológica real de cada área. Os resultados negativos da SESAP/RN podem ser explicados pelo número de espécimes de triatomíneos coletado pelos agentes de endemias nas UDs (no máximo cinco), que muitas vezes chegam mortos nas URSAPs e não são examinados. O método direto aliado à inexperiência na identificação do parasito pode passar a ideia de falso-negativo. Esse método

ainda é o mais utilizado para determinar a infecção do *T. cruzi* em triatomíneos e amostras clínicas de casos suspeitos de infecção, sendo necessária a realização de um teste confirmatório (IBÁÑEZ-CERVANTES et al., 2013). Trata-se de um método que apresenta algumas limitações, como a baixa sensibilidade e reprodutibilidade, pois o resultado varia de acordo com o observador. Além de existir certa dificuldade de examinar os triatomíneos de acordo com o seu estágio evolutivo, é necessário que o inseto esteja vivo (PIZARRO, LUCERO & STEVENS, 2007). Todavia, o uso da PCR possibilita a detecção específica do *T. cruzi* (DUFFY, BISIO & ALTCHEH, 2009; SCHIJMAN et al., 2011), eliminando resultados falsos positivos que poderiam ser gerados por profissionais que não possuem experiência na identificação do parasito (IBÁÑEZ-CERVANTES et al., 2013).

No ambiente silvestre, a infecção natural pelo *T. cruzi* foi mais elevada em *P. lutzi* (64,8%), seguida do *T. pseudomaculata* (33,3%) e *T. brasiliensis* (4%). A PCR multiplex confirmou o resultado de amostras positivas para *T. cruzi* no exame direto e na PCR do *kDNA* e permitiu a detecção da infecção por *T. rangeli* em um exemplar de *P. lutzi* pela primeira vez na mesorregião oeste do RN, ampliando a área de distribuição e as espécies de vetores que esse parasito circula. A identificação do *T. rangeli* em *P. lutzi* aqui descrita reforça a ideia de que resultados falso-positivos no diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* podem ocorrer, como têm sido descritos anteriormente (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004). Esse parasito foi detectado no conteúdo intestinal do *T. brasiliensis* (BARBOSA-SILVA, 2013), em *R. prolixus* (TEJERA, 1920), *P. megistus* (LUCENA & VERGETTI, 1973), *R. pallescens* (VASQUEZ et al., 2004) e *R. nasutus* (DIAS et al., 2007), reforçando o uso de técnicas moleculares para comprovar a infecção.

A caracterização genética dos isolados do *T. cruzi* demonstrou a presença de TcII e TcIII em *T. brasiliensis* e somente TcIII em *P. lutzi*. Estudos anteriores identificaram essas DTUs circulando nessas espécies no semiárido do RN (CÂMARA et al., 2010; MARTINS et al., 2015) e destacam a necessidade de entender a distribuição da população de *T. cruzi* nessa área.

O TcII é encontrado predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul, onde foi isolada principalmente dos ciclos de transmissão domésticos, porém, a sua verdadeira extensão ainda não é bem conhecida (ZINGALES et al., 2012). Câmara et al. (2010) relataram a alta frequência de TcII em 91,7% dos isolados de indivíduos infectados e em 50% do *T. brasiliensis* no RN, mostrando a predominância dessa DTU no ciclo de transmissão doméstico. Todavia, os nossos resultados mostraram que essa DTU está associada ao ciclo de transmissão silvestre, circulando em *T. brasiliensis*. No ambiente

silvestre, os vetores e hospedeiros naturais de TcII se mostraram indescritíveis e a maioria dos isolados relatados foram de primatas e esporadicamente de outras espécies de mamíferos (FERNANDES et al., 1999; ZINGALES et al., 1999; LISBOA et al., 2007).

TcIII é uma DTU silvestre identificada em vários países, incluindo o Brasil, e pode ser encontrada tanto em humanos (MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2009; LLEWELLYN et al., 2009; MARTINS et al., 2015) quanto em cães (CHAPMAN et al., 1984; CARDINAL et al., 2008). A infecção por TcIII também foi observada em animais silvestres (carnívoros, marsupiais, roedores) e domésticos (HERRERA et al., 2005; MARCILI et al., 2009; LLEWELLYN et al., 2009), que são fontes de alimento para os triatomíneos. Contudo, os vetores que participam do ciclo de transmissão desta DTU não são bem conhecidos, mas as espécies que parecem estar envolvidas pertencem aos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma* (MILES et al., 2009). O TcIII tem sido isolado de espécies como *T. rubrovaria*, *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *Rhodnius robustus* (Larrousse, 1927), *Rhodnius brethesi* (MARCILI et al., 2009) e *T. brasiliensis* e *P. lutzi* (CÂMARA et al., 2010). O elevado índice de infecção natural de *P. lutzi* por TcIII aqui descrito pode ser explicado pela associação desse triatomíneo com ecótopos de tatus (LENT & WYGODZINSKY, 1979), que é conhecido como reservatório dessa DTU (MILES et al., 2009). A infecção do *T. brasiliensis* e *P. lutzi* por TcIII e a presença constante destes vetores nos ambientes antrópicos no estado do RN ressaltam o risco de introdução desse grupo genético no ciclo de transmissão domiciliar do parasito. Este estudo contribuiu para a identificação do *T. cruzi* em triatomíneos capturados no campo, demonstrando ainda que o *T. cruzi* II e III predominam na área de conservação da ESEC-Seridó e mostram a necessidade de pesquisas futuras para o planejamento das estratégias de controle dessas espécies de triatomíneos nativas (*T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *P. lutzi*) que apresentam elevados índices de infecção pelo *T. cruzi* e são frequentemente encontradas nos ecótopos antrópicos, a fim de prevenir a infecção humana.

O hábito alimentar das espécies de triatomíneos capturadas nos ecótopos artificiais revelou que *G. gallus* constitui a principal fonte de alimentação para *T. pseudomaculata*. O sangue desta ave também foi detectado em muitos exemplares de *T. brasiliensis* encontrados tanto no galinheiro quanto no curral. Isso se deve a proximidade desses dois ecótopos na maioria das UD's investigadas e a mobilidade dessa ave no peridomicílio. Dados semelhantes foram observados em estudos realizados no Ceará (VALENÇA-BARBOSA et al., 2015) e em Pernambuco (SILVA et al., 2017). O fato de *G. gallus* ter sido a principal fonte alimentar para *T. pseudomaculata* e a sua detecção em *T. brasiliensis* no peridomicílio, mostra que essa ave é

conhecida por ser responsável pela manutenção de elevadas densidades de colônias dessas espécies (COSTA et al., 1998; WHO, 2002). Além de *G. gallus*, um espécime de *T. pseudomaculata* foi encontrado alimentado com uma espécie de lagarto conhecida no semiárido como tejo (*Tupinambus teguxin*). Os répteis são vertebrados refratários à infecção pelo *T. cruzi*, porém, como as aves e anfíbios, desempenham um papel importante em alguns ecótopos, pois servem de fonte de alimentação para várias espécies de triatomíneos (WHO, 2002) e contribui para manter as infestações, especialmente na ausência de animais de sangue quente (SARQUIS et al., 2004; BRENIÈRE et al., 2004). Estudos para a detecção de fonte alimentar realizados no Ceará (FREITAS et al., 2005) e em Pernambuco (SILVA et al., 2017) demonstraram o ecletismo alimentar de *T. pseudomaculata* usando o método de precipitina. As fontes de alimentação identificadas por esses autores foram ave, roedores, cão, gambá, cabra e sangue humano. Além dessas, Freitas et al. (2005) mostraram que o lagarto, boi, gato, porco e a barata também são fontes de alimento para essa espécie.

Os triatomíneos são insetos estritamente hematófagos, porém, quando estão em condições adversas podem se alimentar de fontes alternativas, ou seja, de outros insetos, como já relatado. Espécies como *T. rubrovaria* e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) conseguem completar o ciclo de vida por meio da hemolinfagia em Blatídeos (LOROSA et al., 2008). Outra espécie já encontrada alimentada com barata foi a *T. pseudomaculata* (FREITAS et al., 2005). Segundo Lorosa et al. (2008) isto é considerado um traço de ancestralidade com os predadores da família Reduviidae, cujo comportamento é compatível.

No peridomicílio, *T. brasiliensis* mostrou-se bastante eclético em relação ao seu hábito alimentar, sendo identificado o DNA de humano (*H. sapiens*), bovino (*B. indicus*), cão (*C. familiaris*), cabra (*C. hircus*), preá (*G. spixii*) e ovelha (*O. aries*), além do sangue de galinha (*G. gallus*). O sangue humano consistiu na principal fonte alimentar de *T. brasiliensis* tanto no intradomicílio quanto no peridomicílio e foi detectado em muitos espécimes de *T. pseudomaculata*. Neste estudo, a identificação do DNA humano no conteúdo intestinal de ninfas do *T. brasiliensis* encontradas no intradomicílio é preocupante, pois indica que esse vetor está colonizando o ambiente antrópico e alimentando-se dos seres humanos. Esses dados ressaltam a importância da efetividade do controle vetorial e sustentabilidade da vigilância epidemiológica no município de Caraúbas, onde *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* estão presentes no ambiente antrópico, com elevados índices de infecção pelo *T. cruzi*, e estão interagindo com o homem e animais domésticos, utilizando-os como fonte alimentar.

A adaptação desses triatomíneos às UDs e a circulação do *T. cruzi* entre eles e os animais domésticos e silvestres são fundamentais para o estabelecimento da infecção humana

(COURA & BORGES-PEREIRA, 2010). Nós demonstramos que o *T. cruzi* está supostamente circulando entre *T. brasiliensis* e animais domésticos, tais como, cão, cabra e ovelha. Esses animais atuam como reservatórios domésticos e peridomésticos do parasito (FERNANDES et al., 1994; WHO, 2002), o que aponta um risco constante de transmissão em Caraúbas.

A detecção do DNA de cão em um dos exemplares de triatomíneos infectados é preocupante, pois, segundo Cohen e Gurtler (2001), esse animal apresenta elevada infectividade para triatomíneos e infecção prolongada, o que o torna um fator de risco de transmissão do parasito no ambiente antrópico. Além disso, a infecção em cães é mais elevada em áreas onde *T. brasiliensis* é predominante (ALENCAR, 1987). Em muitos locais, o cão pode funcionar como a principal fonte de alimentação para os triatomíneos, mais do que as galinhas (GURTLER et al., 2009) e humanos.

Os caprinos são animais considerados importantes fontes de alimentação para os triatomíneos no ambiente peridomiciliar (CASTILLO, 1988). Um estudo realizado por Marcondes et al. (1991) demonstrou a superioridade de espécimes alimentados com cabra no peridomicílio em relação a cães e gatos. Castillo (1988) mostrou que de 107 exemplares de *T. brasiliensis* capturados em currais 45% estavam alimentados com sangue de cabra e 24% desses estavam infectados com o *T. cruzi*, destacando o potencial desses animais na infecção de triatomíneos.

G. spixii foi o único mamífero silvestre detectado no intradomicílio e peridomicílio, sugerindo que este animal pode estar atuando como reservatório do *T. cruzi* nesses ambientes e fazendo a ligação entre os ciclos de transmissão domiciliar, peridomiciliar e silvestre do parasito. Dados recentes sugerem que esse roedor pode ser considerado a principal fonte alimentar de várias espécies de triatomíneos e o principal reservatório do *T. cruzi* (VALENÇA-BARSOSA et al., 2015).

No ambiente silvestre, a infecção de *T. brasiliensis* pode estar associada a roedores como preá (*G. spixii*) e punaré (*T. apereoides*), que foram identificados como fontes de alimentação de espécimes infectados. Esse resultado corrobora as suspeitas de Lent e Wygodzinsky (1979) em relação à associação entre *T. brasiliensis* e roedores em afloramento de rochas. Dados recentes mostraram a detecção de *G. spixii* como fonte de alimentação de *T. brasiliensis* no RN (ALMEIDA et al. 2016) e Ceará (BEZERRA et al. 2014). A maioria das espécies de roedores é predominantemente silvestre, porém, algumas têm hábito sinantrópico, como é o caso do preá, o qual pode ser encontrado nos ecótopos artificiais, servindo como elo entre esses ambientes (ROQUE et al., 2008). Bezerra et al. (2014) relataram a prevalência de

espécies de *T. brasiliensis* do ambiente silvestre alimentados com preá (31,1%) e outro roedor nativo, o *Kerodon rupestris* (25%).

A detecção do DNA humano (*H. sapiens*) e cabra (*C. hircus*) em *T. brasiliensis* no ambiente silvestre pode estar relacionada com a proximidade a uma fazenda habitada vizinha a ESEC-Seridó, na qual foram observados animais domésticos e alguns afloramentos de rochas. Os caprinos constituem fonte alimentar importante para triatomíneos silvestres (LUCENA, 1970), como observado neste trabalho. Alencar (1987) mostrou que *T. brasiliensis* alimenta-se de cabras em todos os ambientes, especialmente no silvestre e em locais de pedras.

Neste estudo, a extração por fenol-clorofórmio foi utilizada pela primeira vez na identificação de fonte alimentar de triatomíneos. Os dados mostraram que a concentração de DNA após a extração foi semelhante ao *Kit* comercial, a sensibilidade do ensaio de PCR revelou bons resultados e as identidades das amostras comparadas com sequências do *GeneBank* foram superiores a 95%. Portanto, este método de extração pode ser utilizado com segurança nos ensaios de PCR para a identificação de fonte alimentar, reduzindo os custos da técnica, principalmente no que se refere à aquisição de *Kits*. Almeida et al. (2016) relataram que o estado nutricional dos triatomíneos ou a quantidade de diferentes fontes alimentares presentes no conteúdo intestinal pode interferir para o sucesso da PCR. Porém, com o uso do método fenol-clorofórmio, a identificação da fonte alimentar foi possível em amostras de triatomíneos com pouco conteúdo intestinal, validando-o para esse tipo de estudo.

Os espécimes de *Triatoma* sp. capturados na ESEC-Seridó foram analisados para identificar e estabelecer a sua relação com *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae*, uma vez que apresentaram características de ambas as espécies. De acordo com os caracteres morfológicos, *Triatoma* sp. e *T. petrocchiae* formaram um só clado, indicando que pode ser uma única espécie. Apesar da semelhança, *T. petrocchiae* difere do *T. brasiliensis* por apresentar o primeiro artículo antenal, rostro glabro e ausência de fosseta esponjosa nos machos e fêmeas (LENT & WYGODZINSKY, 1979), características observadas em *Triatoma* sp. Por outro lado, a presença de manchas amarela visível na lateral do pescoço, pronoto marrom escuro e processo posterior do escutelo com ápice arredondado e levantado são características descritas no *Triatoma* sp. que são semelhantes ao *T. brasiliensis*. Variações morfológicas já foram descritas em várias espécies do gênero *Triatoma*, tais como *T. infestans*, *T. rubrovaria*, *T. pseudomaculata* e *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), o que contribui para mudanças no status taxonômico (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

A classificação das espécies de triatomíneos avançou com o uso de abordagens multidisciplinares, contribuindo para a identificação mais precisa dos membros da Subfamília Triatominae e outros grupos de insetos. As classificações independentes da morfologia possibilitaram o estudo da variabilidade fenotípica e polimorfismos dentro de uma espécie e a avaliação do processo evolutivo (PACHECO et al., 2007; COSTA et al., 2013). Vários marcadores moleculares já foram utilizados com o intuito de fornecer informações relacionadas à variabilidade genética dos triatomíneos por meio da detecção de polimorfismo do DNA como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (VENDRAMI et al., 2013), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (BORGES, ROMANHA & DIOTAIUTI, 2000; PACHECO et al., 2007), sequenciamento de genes nucleares (BARGUES et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; MARCILLA et al., 2001; BARGUES et al., 2002; MARCILLA et al., 2002; DORN et al., 2009) e mitocondriais (LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2000, 2004; HYPISA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2009). Nós utilizamos os marcadores nuclear (ITS-1) e mitocondrial (*Cyt b*) para avaliar a relação taxonômica existente entre *Triatoma* sp., *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae*. Esses marcadores são importantes por apresentar taxas evolutivas distintas, sendo necessária uma comparação de ambas para melhor explicar a história evolutiva de um organismo. Além disso, regiões que evoluem rapidamente são adequadas para o estudo de organismos muito próximos, enquanto aquelas de evolução mais lenta são mais apropriadas para comparação entre táxons mais distantes (ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2005).

Diferentes regiões do DNA ribossômico nuclear (rDNA), tais como os espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2), são marcadores importantes para estudos sistemáticos, filogenéticos e na distinção de espécies, em experimentos de hibridação e no estabelecimento de parentesco entre os táxons (MARCILLA et al., 2001). Esses marcadores são compostos por sucessivas sequências repetidas (ALMEYDA-ARTIGAS, BARGUES & MAS-COMA, 2000), cuja unidade de repetição é entre 1 e 5pb e, por isso, são considerados bons para o estudo de diferenciação populacional de uma determinada espécie (JARNE & LAGODA, 1996). Marcilla et al. (2001) descreveram que o sequenciamento de apenas um dos ITS é suficiente, pois são estruturas conservadas com evidente co-evolução.

A similaridade genética entre *Triatoma* sp. e *T. petrocchiae* usando o marcador nuclear ITS-1 foi demonstrada com a formação de um único clado. No entanto, na filogenia baseada em *Cyt b*, esses insetos formaram clados independentes entre si e também diferentes do clado composto por *T. brasiliensis*. Os dados obtidos a partir do marcador mitocondrial sugerem que *Triatoma* sp. pode constituir uma espécie nova.

Na análise com ambos os marcadores, os exemplares de *T. brasiliensis* capturados no RN formaram um clado com amostras de outros membros do complexo (*T. b. macromelasoma* e *T. juazeirensis*), cujas sequências foram depositadas no *GeneBank* por Monteiro et al. (2004), sugerindo que *T. juazeirensis* pode ser uma subespécie de *T. brasiliensis*, uma vez que todas as amostras dessa espécie estão intercaladas nas árvores filogenéticas com sequências de *T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma*, não fornecendo suporte para a separação destes três grupos. Porém, estudos com um maior número de marcadores nucleares e mitocondriais ainda são necessários para confirmar a separação desses membros do complexo de espécie *T. brasiliensis*.

Vários estudos demonstraram que esse complexo forma um grupo monofilético (MONTEIRO et al., 2004; GARDIM et al., 2014), o qual inclui duas subespécies (*T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma*) e seis espécies (*T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki*, *T. bahiensis*, *T. lenti* e *T. petrocchiaie*) (COSTA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Contudo, as análises filogenéticas aqui realizadas sugerem que *T. petrocchiaie* pode não estar incluído no complexo de espécie *T. brasiliensis*, assim como o *Triatoma* sp., pois os ramos que ligam essas espécies estão bem distantes.

As perspectivas deste estudo incluem a realização de novas análises do *Cyt b* e ITS-1 incluindo os mesmo táxons com o objetivo de solucionar problemas relacionados a desbalanceamento de classes e atração de ramos (longos e curtos). Além disso, possivelmente outros marcadores serão utilizados para dar suporte na identificação do *Triatoma* sp. ou verificar a possibilidade de ocorrência de uma nova espécie.

7 CONCLUSÕES

- As atividades de vigilância entomológica foram exercidas nos 11 anos de forma ininterrupta em um baixo número de municípios do Rio Grande do Norte considerados de alto e médio risco, apontando a descontinuidade do controle e a falta de prioridade na prevenção da transmissão;
- A presença das espécies *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* infectadas nas unidades domiciliares é preocupante, o que torna de extrema importância à realização das atividades de vigilância entomológica de forma contínua, a fim de impedir a colonização no intradomicílio e evitar o contato desses vetores com os seres humanos e animais;
- A colonização intradomiciliar da espécie *Panstrongylus lutzi* foi registrada pela primeira vez em um município da mesorregião Agreste, um da mesorregião Central e seis da mesorregião Oeste do estado do Rio Grande do Norte;
- A colonização intradomiciliar da espécie *Rhodnius nasutus* foi registrada pela primeira vez em quatro municípios da mesorregião Agreste, quatro da mesorregião Central e 13 da mesorregião Oeste do estado do Rio Grande do Norte.
- Os dados evidenciam e reforçam a necessidade de organização e priorização das atividades de controle de triatomíneos e vigilância epidemiológica no município de Caraúbas da mesorregião Oeste do estado do Rio Grande do Norte;
- Os elevados índices de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* das espécies de triatomíneos observados no intradomicílio e peridomicílio indicam a necessidade de manter as atividades de vigilância entomológica contínuas para prevenir a colonização desses ambientes e a transmissão do parasito para a população e animais domésticos do município;
- O encontro de *Triatoma brasiliensis* infectados, alimentados com sangue humano e de *Canis familiaris*, *Galea spixii*, *Capra hircus* e *Ovis aries*, demonstra o ecletismo desta espécie quanto ao hábito alimentar no peridomicílio e intradomicílio, e sugere que esses animais podem estar atuando como reservatórios do *Trypanosoma cruzi* no peridomicílio.
- A colonização do *Triatoma brasiliensis* no intradomicílio reforça a importância desta espécie como vetor do *Trypanosoma cruzi*;
- A colonização peridomiciliar por *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* e a associação destas espécies a ambientes artificiais sugere que estão bem adaptados e devido aos elevados índices de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, necessitam de atenção constante por parte da vigilância epidemiológica;

- O método de extração por fenol-clorofórmio mostrou-se uma excelente ferramenta no estudo do hábito alimentar de triatomíneos, sendo possível a identificação da fonte de alimentação em espécimes com diferentes estágios nutricionais.
- A ocorrência de *Psammolestes tertius* foi registrada pela primeira vez no estado do Rio Grande do Norte, ampliando área de distribuição dessa espécie;
- A identificação do *Trypanosoma rangeli* em triatomíneos da espécie *Panstrongylus lutzi* foi registrada pela primeira vez no estado, ampliando a área de ocorrência deste protozoário no Brasil;
- O intercâmbio entre os ciclos de transmissão silvestre e doméstico do *Trypanosoma cruzi* parece estar sendo realizado por *Galea spixii*, uma vez que este roedor foi identificado como fonte alimentar de espécimes de *Triatoma brasiliensis* capturados no habitat natural e artificial.
- As análises morfológica e genética usando o marcador ITS-1 mostraram que o *Triatoma* sp. apresentou similaridade com o *Triatoma petrocchiai*;
- A análise filogenética baseada no marcador *Cyt b* mostrou acentuada distância genética entre *Triatoma* sp., *T. petrocchiai* e os membros do complexo de espécies *Triatoma brasiliensis*, sugerindo que parece ser uma espécie nova;
- Com base nos marcadores *Cyt b* e ITS-1, as sequências de *Triatoma juazeirensis* depositadas no *GeneBank* formaram um único clado com as sequências de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* e *Triatoma brasiliensis macromelasoma*, mostrando uma similaridade genética entre elas, indicando que essa espécie pode ser uma subespécie do complexo *Triatoma brasiliensis*;
- As análises fundamentadas nos marcadores *Cyt b* e ITS-1 apontam que *Triatoma petrocchiai* pode não pertencer ao complexo de espécies *Triatoma brasiliensis* devido à distância genética demonstrada entre essas espécies.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A IMPRENSA. Entrevista com Carlos Chagas. A Imprensa, Rio de Janeiro, 6 ago., p. 4, 1911.
- ABAD-FRANCH, F. & MONTEIRO, A. F. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 437-454, 2005.
- ABAD-FRANCH, F. et al. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 2, p. 251-254, 2013.
- AB'SÁBER, A. N. O domínio morfoclimático semiárido das Caatingas brasileiras. *Geomorfologia*, v. 43, p. 1-139, 1974.
- ALENCAR, J. E. Estudos sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. III Região do Baixo Jaguaribe. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 17, n. 2, p. 149-158, 1965.
- ALENCAR, J. E. História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará, Imprensa Universitária, Fortaleza, CE, p. 341, 1987.
- ALEVI, K. C. C. et al. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infection Genetics and Evolution*, v. 12, n. 8, p. 1652-1653, 2012.
- ALEVI, K. C. C. et al. Description of diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae). *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, p. 1-9, 2016.
- ALMEIDA, C. E. et al. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 6, p. 761-768, 2000.
- ALMEIDA, C. E. et al. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brasil? *Medical and Veterinary Entomology*, v. 23, n. 4, p. 410-417, 2009.
- ALMEIDA, C. E. et al. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Tropica*, v. 122, n. 1, p. 71-79, 2012.
- ALMEIDA, C. E. et al. Molecular Individual-Based approach on *Triatoma brasiliensis*: inferences on triatomine foci, *Trypanosoma cruzi* natural infection prevalence, parasite diversity and feeding sources. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0004447, 2016.
- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J., BARGUES, M. D. & MAS-COMA, S. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology*, v. 86, n. 3, p. 537-44, 2000.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO RIO GRANDE DO NORTE 2015. Disponível em <<http://www.idema.rn.gov.br>> Acesso em 10 de agosto de 2016.
- ARAGÃO, M. B. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? *Revista de Saúde Pública*, v. 17, p. 51-55, 1983.

BACIGALUPO, A. et al. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 5, p. 633-641, 2010.

BARBOSA DA SILVA, J. R. et al. Dengue in Brazil: current situation and control activities. *Epidemiological Bulletin*, v. 23, n. 1, p. 3-6, 2002.

BARBOSA-SILVA, A. N. *Distribuição da fauna triatomínica e infecção natural pelo Trypanosoma cruzi em diferentes municípios do semiárido do Rio Grande do Norte*. 2013. 72f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BARGUES, M. D. et al. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vector of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 567-573, 2000.

BARGUES, M. D. et al. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 1, p. 159-164, 2002.

BEZERRA, C. M. et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the *Caatinga* area colonised by *Triatoma brasiliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 887-898, 2014.

BORGES, E. C., ROMANHA, A. J. & DIOTAIUTI, L. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in the populational study of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, Sup. 2, p. 97-100, 2000.

BORGES, E. C. et al. Dynamic between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) at the municipality of Independência, northeastern Brazil. *Acta Tropica*, v. 93, p. 119-126, 2005.

BORGES-PEREIRA, J. et al. Epidemiology of Chagas disease in four rural localities in Jaguaruana, State of Ceará. Seroprevalence of infection, parasitemia and clinical characteristics. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 345-351, 2008.

BOSSENO, M. F. et al. Short report: identification in triatomine vector of feeding source and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, p. 303-305, 2006.

BOSSENO, M. F. et al. Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, p. 998-991, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), Divisão de Doença de Chagas. *Manual de Normas Técnicas da Campanha de Controle da Doença de Chagas*. 1ª ed. Brasília, DF: Centro de Documentação do Ministério da Saúde; 1980.

BRASIL. Brasil 1996. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. *Controle da Doença de Chagas, Diretrizes Técnicas*. 2ª edição. Brasília: FUNASA, 80p, 1996

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, p. 1-30, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

BRENER, Z. Laboratory-acquired Chagas disease: comment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 3, p. 527, 1987.

BRENIERE et al. Feeding patterns of *Triatoma longipennis* Usinger (Hemiptera, Reduviidae) in peridomestic habitats of a rural community in Jalisco State, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 1015-1020, 2004.

BRITTO, C. et al. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 1, p. 171-172, 1993.

BRITO, C. R. N. et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 346-352, 2012.

BRONFEN, E. et al. Isolamento de amostras de *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 2, p. 237-240, 1989.

BURGOS, J. M. et al. Direct molecular profile of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 1319-1327, 2009.

BUSVINE, J. & BARNES, M. Observations on mortality among insects exposed to dry insecticidal films. *Bulletin of Entomological Research*, v. 38, p. 81-90, 1947.

CÂMARA, A. C. J et al. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Tropica*, v. 115, n. 3, p. 205-211, 2010.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I- Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 6, p. 93-100, 1964.

CARANHA, J. et al. Feeding sources evaluation of *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the State of Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p. 347-351, 2006.

CARANHA, L. et al. New records and geographic distribution map of *Triatoma petrocchiae* Pinto and Barreto, 1925 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Check List*, v. 7, n. 4, p. 508-509, 2011.

CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L. et al. Behavioral plasticity of Triatominae related to habitat selection in northeast Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 45, 14-19, 2008.

- CARDINAL, M. V. et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International Journal of Parasitology*, v. 38, p. 1533-1543, 2008.
- CASTILLO, A. R. F. *Estúdio epidemiológico de la infección humana y caprina por Trypanosoma cruzi em la área rural del município de São Sebastião de Umbezeiro, Paraíba*. 1988. Dissertação (Mestrado Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1988.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular, Biology and Evolution*, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.
- CASTRO-FILHO, J. & SILVEIRA, A. C. Distribuição da Doença de Chagas no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 31, p. 85-89, 1979.
- CECERE, M. C. et al. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *American Journal of Medicine*, v. 7, p. 803-810, 2004.
- CERQUEIRA, E. M. et al. Epidemiological Surveillance in the Process of Municipalization of the Health System in Feira de Santana-BA. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 12, n. 4, p. 213-223, 2003.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHAPMAN, M. D. et al. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *The Journal of Protozoology*, v. 31, n. 3, p. 482-6, 1984.
- CHOW, E., WIRTZ, R. A. & SCOTT, T. W. Identification of bloodmeals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *American Mosquito Control Association*, n. 9, p. 196-205, 1993.
- COHEN, J. E. & GURTLER, R. E. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science*, v. 293, p. 694-698, 2001.
- CORREIA, N. et al. Crossing experiments confirm *Triatoma sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Tropica*, v. 128, p. 162-167, 2013.
- CORTEZ, M. R. et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Experimental Parasitology*, v. 114, n. 4, p. 305-313, 2006.
- COSTA, J. et al. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1909 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genital structure and eggs of different chromatic forms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 4, p. 493-498, 1997a.
- COSTA, J. et al. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 4, p. 459-464, 1997b.

COSTA, J. et al. Ecotopes, natural infection and thophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 1, p. 7-13, 1998.

COSTA, J. & MARCHON-SILVA, V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 5, p. 23-34, 1998.

COSTA, J., PETERSON, A. T. & BEARD, C. B. Ecological Niche Modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, p. 516-567, 2002.

COSTA, J. et al. 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*, v. 98, n. 4, p. 443-449, 2003a.

COSTA, J. et al. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 5, p. 637-639, 2003b.

COSTA, J., ARGOLO, A. M. & FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, v. 1385, p. 47-52, 2006.

COSTA, J. & FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 87-90, 2007.

COSTA, J.; PETERSON, A. T. & DUJARDIN, J. P. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, n. 2, p. 263-270, 2009.

COSTA, J. et al. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 6, p.785-789, 2013.

COSTA, J. et al. Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 238, 2014.

COURA, J. R. et al. Morbidade da doença de Chagas. II-Estudos seccionais em quatro áreas de campo do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 79, n. 1, p. 101-124, 1984.

COURA, J. R. et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 3, p. 278-279, 1996.

COURA, J. R. et al. The initiative for the control of Chagas disease in the Americas and in non-endemic countries. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 42, p. 106-110, 2009.

COURA, J. R. & DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, Sup. 1, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R. & BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; VINÃS, P. A. & JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 856-862, 2014.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmission – A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

D'ÁVILA D. A. et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 1718-1725, 2009.

DEGRAVE, W. et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 27, p. 63-70, 1988.

DIAS, E. & PELLEGRINO, J. Alguns ensaios com o “Gamexanne” no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Brasil Médico*, v. 62, p. 185-190, 1948.

DIAS, E. Profilaxia da doença de Chagas. *O hospital*, v. 51, p. 53-67, 1957.

DIAS, F. B. S. et al. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceara, Brazil in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1959 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 643-645, 2007.

DIAS, J. C. P. *Epidemiology of Chagas' disease*. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A., editors. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): it's impact on transfusional and clinical medicine. São Paulo: ISBT Brazil' 92; 1992.

DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. *Epidemiologia*. In: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. (Orgs.). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 33-66.

DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 4, p. 373-383, 1998.

DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. The Evolution of Chagas Disease (American trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, Supl. 1, p.103-121, 1999.

DIAS, J. C. P. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, Sup. 2, p. 43-59, 2000.

DIAS, J. C. P. et al. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern region, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, Sup. 2, p. 13-34, 2000.

DIAS J. C. P. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC. *O controle da Doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: uma iniciativa internacional*. Organização Pan-Americana da Saúde / Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 316pp, 2002.

DIAS, J. C. P. et al. Doença de Chagas em Lassance, MG. Reavaliação Clínico-epidemiológica 90 anos após a descoberta de Carlos Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 2, p. 167-176, 2002.

DIAS, J. C. P. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, Sup. 1, p. 11-18, 2007.

DIAS, J.C. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 269-300, 2008.

DIAS, J. C. P. et al. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Epidemiologia e Serviço de Saúde*, v. 25 (núm. esp.), p. 7-86, 2016.

DIAS-LIMA, A. G. & SHERLOCK, I. A. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 611-613, 2000.

DIAS-LIMA, A. G. et al. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n. 6, p. 989-990, 2003.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, v. 26, n. 3, p.297-302, 1945.

DIOTAIUTI, L. et al. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 35, n. 3, p. 237-245, 1993.

DIOTAIUTI, L. et al. Evaluation of the Chagas disease vector control program in Minas Gerais, Brasil, with special reference to *Triatoma sordida*. *Bulletin of the Pan American Health Organization*; v. 28, p. 211-219, 1994.

DIOTAIUTI, L. et al. Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, Sup. 2, p. 61-67, 2000.

DORN, P. L. et al. Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 3, n. 3, p. e393, 2009.

DUFFY, T., BISIO, M. & ALTCHER, J. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, p. e419, 2009

DUJARDIN, J. P., SCHOFIELD, C. J. & TIBAYRENC, M. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 12, n. 1, p. 20-29, 1998.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p.175-185, 1998.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, v.5, p.113, 2004a.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004b.

ESPINOLA, H. N. Brasil. In CARCAVALLO, R. W., RABINOVICH, J. E. AND TONN, R. J. *Factores biológicos y ecologicos en la enfermedad de Chagas*, 2. Argentina. Servicio Nacional de Chagas, 1985.

FERNANDES, A. J. et al. CHIARI, E. Infecção natural das glândulas anais de gambás (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 1, p. 87-93, 1989.

FERNANDES, A. J. et al. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 10, n. 4, p. 473-480, 1994.

FERNANDES, O. et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, Sup. 1, p. 195-7, 1999.

FERNANDES, O. et al. 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*, v. 95, n. 1, p. 97-99, 2001.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 14, p. 265-299, 1980.

FORATTINI, O. P. et al. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na Região Nordeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 15, p. 113-64, 1981.

FOX, I., BAYONA, I. G. & OROZCO, H. I. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *Bulletin World Health Organization*, v. 35, p. 974-976, 1966.

FREDERICI, E. E., ABELMANN, W. H. & NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 13, p. 272-280, 1964.

FREITAS, S. P. C. et al. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceará, Brasil Feeding patterns of *Triatoma pseudomaculata* in the state of Ceará, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, n. 1, p. 27-32, 2005.

FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, v. 2, p. 226-235, 2006.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Coordenação Regional do Rio Grande do Norte. *Projeto de Controle de Doenças Endêmicas no Nordeste*. Rio Grande do Norte, FUNASA; 1996.

GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, v. 202, n. 1, p.1-36, 2003.

GALVÃO, C., PAULA, A. S. *Sistemática e evolução dos vetores*. In: Galvão C, editor. *Vetores da doença de Chagas*. Curitiba (PR): Sociedade Brasileira de Zoologia 2014. p. 118.

GARCIA, M. H. H. M. et al. Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceará, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, p. 410-415, 2005.

GARDIM, S. et al. A. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 23, p. 74-79, 2014.

GOMES, M. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Experimental Parasitology*, v. 88, n. 1, p. 28-33, 1998.

GUHL, F.; PINTO, N. & AGUILERA, G. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, Sup. 1, p. 71-75, 2009.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *System Biology*, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 46, p. 323-330, 2004.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution, domiciliary infestation and natural infection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Piauí State, Brazil, in 2008. *Revista Pan-Americana Saúde*, v. 1, n. 4, p. 57-64, 2010.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, p. 1-15, 2012.

GURTLER, R. E. et al. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy Sciences*, v. 104, p. 16194-16199, 2007.

GURTLER R. E. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 52-59, 2009.

GURTLER, R. E. et al. Strong host-feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: implications for the epidemiology of Chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, p. e447, 2009.

GURTLER, R. E. & YADON, Z. E. Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, v. 109, n. 2, p. 91-98, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.

HERRERA, L. et al. *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*, v. 99, p. 379-388, 2005

HYPISA, V. et al. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 23, p. 447-457, 2002.

HORTEZ P. J et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 9, p: e300, 2008.

HUANG, X. & MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Reserach*, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

IBÁÑEZ-CERVANTES, G. et al. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitology International*, v. 62, p. 36-43, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/ufs/download/mapa_e_municipios.php?uf=rn> Acesso em 10 de agosto de 2016.

JARNE, P. & LAGODA, P. J. L. Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 11, p. 424-430, 1996.

KITANO, T. et al. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International Journal of Legal Medicine*, v. 121, p. 423-427, 2007.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, p. 435-441, 2001.

LENT, H. & OLIVEIRA, S. J. Nota preliminar sobre a ação do DDT (dicloro-difeniltricloetana) em insetos transmissores da doença de Chagas. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 4, p. 329-331, 1944.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. New York, p. 163, 1979.

- LILIOSO, M. et al. High *Triatoma brasiliensis* Densities and *Trypanosoma cruzi* Prevalence in Domestic and Peridomestic Habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The Source for Chagas Disease Outbreaks? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 6, p. 1456-1459, 2017.
- LIMA, J. T. F. Incremento do programa de controle da doença de Chagas no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 16, p. 128-129, 1983.
- LIMA, M. M. et al. Risk presented by *Copernicia prunifera* palm trees in the *Rhodnius nasutus* distribution in a Chagas disease-endemic area of the Brazilian northeast. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, p. 750-754, 2008
- LISBOA, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Experimental Parasitology*, v. 116, p. 150-155, 2007.
- LLEWELLYN, M. S. et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas' disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, p. :e510, 2009.
- LOROSA, E. S. et al. Preferência alimentar de ninfas de 1º estágio de algumas espécies de triatomíneos do —complexo oliveirail (Hemiptera, Reduviidae) em condições de laboratório. *Revista brasileira de Zootecias*, v. 10, n. 2, p. 163-170, 2008.
- LUCENA, D. T. Subsídios para o estudo epidemiológico da doença de Chagas no Nordeste. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 4, p. 171-175, 1952.
- LUCENA, D. T. & COSTA, L. Epidemiologia da Doença de Chagas na Paraíba. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 6, p. 229-265, 1954.
- LUCENA, D. T. Doença de Chagas no Nordeste. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 11, n. 4, p. 675-696, 1959.
- LUCENA, D. T. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 22, p. 3-173, 1970.
- LUCENA, D. T. & VERGETTI, J. G. Infecção natural de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no interior do Estado de Alagoas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 15, p. 171-178, 1973.
- LUTZ, A. & MACHADO, A. Viagem pelo Rio São Francisco e por alguns dos afluentes entre Pirapora e Juazeiro. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, v. 7, p. 5-62, 1915.
- LYMAN, D. F. et al. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, n. 3, p. 377-386, 1999.
- MACEDO, A. M. et al. fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 55, p. 147-153, 1992.

- MARCILLA, A. et al. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Molecular, Phylogenetic and Evolution*, v. 18, n. 1, p. 136-42, 2001.
- MARCILLA, A. et al. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 1, p. 225-235, 2002.
- MARCILI, A. et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 615-623, 2009.
- MARCONDES, C. B. et al. Estudos epidemiológicos de fontes de alimentação sanguínea dos triatomíneos da Fazenda Aroeira (Catolé da Rocha, Paraíba) e curcinvizinhanças. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, p. 137-140, 1991.
- MARTINS, K. et al. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *International Journal of Infectious Disease*, v. 39, p. 68-75, 2015.
- MENDES, B. V. Plantas e Animais Para o Nordeste. Rio de Janeiro: Globo, 167 p, 1987.
- MENDES, B. V. Potencialidades de Utilização da Algarobeira (*Prosopis juliflora* (SW) DC) no Semiárido Brasileiro. *Mossoró: Coleção Mossoroense*, v. 1 n. 2: p. 118-120, 1989.
- MENDONÇA, V. J. et al. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.
- MENDONÇA, V. J. et al. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera; Reduviidae) and phylogeny of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Zootaxa*, v. 4107, n. 2, p. 239-254, 2016.
- MILES, M. A. et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*, v. 136, p. 1509-1528, 2009.
- MONCAYO, A. & SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, Suppl. 1, p. 17-30, 2009.
- MONTEIRO, F. A.; COSTA, J. & SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 92, p. 897-900, 1998.
- MONTEIRO, F. A. et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, p. 460-465, 2000.

- MONTEIRO, F. A. et al. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 32, n. 1, p. 46-56, 2004.
- MONTEIRO et al. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Tropical Medicine & International Health*, v. 15, p. 1049-1051, 2010.
- MOTA, J. et al. Identification of blood meal source and infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas disease vectors using a multiplex cytochrome b polymerase chain reaction assay. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 7, p. 617-27, 2007.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI), 2016. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 16 de agosto de 2016.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil 1986 – 1998. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 297-304, 1999.
- NOIREAU, F. et al. Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 5, p. 583-584, 1997.
- NOIREAU, F. et al. Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, Suppl 1, p. 119-122, 2000.
- NOIREAU, F. et al. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 1, p. 7-10, 2005a.
- NOIREAU, F. et al. Some considerations about the ecology of Triatominae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 431-436, 2005b.
- OLIVEIRA FILHO, A. M. et al. Tratamentos focais e totais com inseticida de ação residual para o controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* no nordeste brasileiro. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, Sup. 2, p. 105-111, 2000.
- OLIVEIRA-LIMA, J. W. et al. Peridomiliary changes and implications for *Triatoma brasiliensis* control. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, n. 2, p. 75-81, 2000.
- OLIVEIRA, J. et al. New Record and cytogenetic analysis of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Bahia State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 2, p.1-6, 2016.
- OLIVEIRA, J et al. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. *Acta Tropica*, v. 170, p. 140-148, 2017.
- OLIVEIRA, J. & ALEVI, K. C. C. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 3, p. 434-435, 2017.

OSTERMAYER, A. L. et al. The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, Sup. 2, p. 108-121, 2011.

PACHECO, R. S. et al. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite*, v. 14, p. 231-237, 2007.

PANZERA, F. et al. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, Sup. 2, p. 83-88, 2000.

PAPA, A. R. et al. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, v. 9, p. 133-146, 2002.

PAULA, M. B. et al. Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 4, p. 9-14, 2010.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. A eficácia do expurgo domiciliário com dieldrin no controle do vetor da doença de Chagas. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 8, p. 289-304, 1956.

PINCHIN, R., OLIVEIRA FILHO, A. M. & PEREIRA, A. C. B. The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Panstrongylus megistus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, p. 801-803, 1980.

PINCHIN, R., FANARA, D. M. & OLIVEIRA FILHO, A. M. A village scale trial of Pirmiphos-methyl (OMS 1424), wettable power and slow-release formulations, in comparison with HCH for the control of *Triatoma infestans* in Brazil. World Health Org., WBC/82.840, 8ps. 1984.

PIRAJÁ-DA-SILVA, M. A. O barbeiro (*Conorhinus megistus* Burm.) na Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina*, v. 1, p. 627-632, 1913.

PIZARRO, J. C., LUCERO, D. E. & STEVENS L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: high rates found in Chuquisaca, Bolivia. *BMC Infectious Diseases*, v. 7, p. 66, 2007.

POSADA, D. Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]*, Chapter 6:Unit 6 5, 2003.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular, Biology and Evolution*, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PRATA AR. Documento elaborado pelo grupo de pesquisadores convidados pelo Ministério da Saúde para a discussão e análise do combate à doença de Chagas pela SUCAM. In: Prata AR, organizador. Situação e perspectivas de controle das doenças infecciosas e parasitárias. Brasília: Editora Universidade de Brasília; p. 317-9, 1981.

RAMOS, C. J. R. et al. Colonization by *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) inside homes in São José do Cerrito, SC: first report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 421-423, 2008.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, p. e0003540, 2015.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, user guide. Exeter Software, New York, 1998.

ROJAS CORTEZ, M. et al. *Ecología de Triatoma infestans y Trypanosoma cruzi, y la implicación de los reservorios silvestres, en los valles andinos de Bolivia*. In: Arias AR e Maldonado M. Taller Del Cono Sur, actualización de la tripanosomiasis americana. Paraguay, 233 pp, 2007.

ROQUE, A. L. R. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, 742-749, 2008.

ROSA, J. A. et al. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*. In press. 2017.

ROMAÑA, C. A. *O controle da tripanossomíase americana requer vigilância ecológica e social da emergência de risco*. In: TEIXEIRA, A. R. L., editores. Doença de Chagas e Evolução. Brasília: Ed.UnB; p. 233–251, 2007

SANTOS, C. B. et al. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 5, p. 471-473, 2005.

SANTOS, F. R., PENA, S. D. J. & EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics*, v. 90, n. 6, p. 655-656, 1993.

SARQUIS, O. et al. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 263-270, 2004.

SARQUIS, O. et al. Aspects of peridomestic ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 2, p. 143-147, 2006.

SARQUIS, O. et al. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *Journal of Vector Ecology*, v. 35, n. 2, p. 385-394, 2010.

SARQUIS, O. et al. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitology Research*, v. 110, n. 4, p. 1481-1485, 2012.

- SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation by year 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 179-181, 2000.
- SCHMUNIS, G. A. & DIAS, J. C. P. La reforma del sector salud, descentralización, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, p. 117-123, 2000.
- SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, Suppl 1, p.75-85, 2007.
- SCHMUNIS, G. A. & YADON, Z. N. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.
- SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, p. e931, 2011.
- SCHOFIELD, C. J. *The biosystematics of Triatominae*. In: Biosystematics of Haematophagous Insects (M. W. Service, ed.), pp. 284-312, special volume 37, Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press, 1988.
- SCHOFIELD, C. J. *Triatominae—Biology & Control*, Eurocommunica, UK, 1994.
- SCHOFIELD, C. J., JANNIN, J. & SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.
- SCHOFIELD, C. J. & GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.
- SHENONE, H. et al. Acción de 7 formulaciones de insecticidas sobre *Triatoma infestans* criados em laboratório. *Bol. Chileno Parasite*, v. 27, p. 14-22, 1972.
- SHERLOCK, I. A. & SERAFIM, E. M. Fauna Triatominae do Estado da Bahia, Brasil. I - As espécies e distribuição geográfica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 6, p. 265-276, 1972.
- SHERLOCK, I. & MUNIZ, T. M. Combate ao *Panstrongylus megistus* com o malathion concentrado. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 9, n. 6, p. 289-296, 1975.
- SHERLOCK, I., MUNIZ, T. M. & GUITTON, N. A ação do malathion sobre os ovos de triatomíneos vetores de doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 10, n. 2, p. 77-84, 1976.
- SHERLOCK, I. A. *Vetores*. In Z Brener, ZA Andrade, M Barral Netto, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 21-40, 2000.
- SILVA, M. B. A. et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the State of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma* infection rates between 2006 and 2007. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p.60-65, 2012.

SILVA, M. B. A. et al. Importância da distribuição geográfica dos vetores da doença de Chagas em Pernambuco, Brasil, em 2012. *Revista de Patologia Tropical*, v. 44, n. 2, p. 195-206, 2015.

SILVA, M. B. A. et al. Description of the feeding preferences of triatominae in the Chagas disease surveillance study for the State of Pernambuco, Brazil (Hemiptera: Reduviidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.50, n. 4, p. 543-546, 2017.

SILVEIRA, A. C., FEITOSA, V. R. & BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/1983, no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 36, p.5-312, 1984.

SILVEIRA, A. C. & VINHAES, M. C. Chagas disease: the epidemiological and control aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, Sup. 2, p. 15-60, 1998.

SILVEIRA, A. C. Profilaxia. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener, Z. A. Andrade & M. Barral Netto, org.), pp. 75-87, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora, 1999.

SILVEIRA, A. C. & VINHAES, M. C. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, Sup. 1, p. 405-411, 1999.

SILVEIRA, A. C. et al. *O controle de Triatoma brasiliensis e Triatoma pseudomaculata. Organização Pan-Americana da Saúde*, Brasília, p.21-27, 2001.

SILVEIRA, A. C. Entomological survey (1975-1983). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, Sup. 2, p. 26-32, 2011.

SILVEIRA, C. A. & DIAS, J. C. P. The control of vectorial transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, Sup. 2, p. 52-63, 2011.

SILVEIRA, A. C., SILVA, G. R. & PRATA, A. O Inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana (1975- 1980). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, sup 2, p. 33-9, 2011.

SILVEIRA, A. C. & MARTINS, E. *Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual*. In: GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, pp. 10-25, 2014.

SIQUEIRA, A. F. Estudos sobre a reação da precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 2, p. 41-53, 1960.

SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. *Nature*, v. 193, p.853-860, 1962.

SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy*. Principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, XV, 1973.

SOUTO, R. P. & ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 62, p. 45-52, 1993.

- SOUTO, R. P., VARGAS, N. & ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Experimental Parasitology*, v. 91, n. 4, p. 306-314, 1999.
- SOUZA, L. C. et al. Descrição de um ecótopo natural do *Panstrongylus lutzi* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em Sobral, Norte do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 26, 2003.
- STAAK, C., ALLMANG, U. K. & MEHLITZ, D. 1981. The complement fixation test for the species identification of bloodmeals from tsetse flies. *Tropenmedizin Und Parasitologie*, v. 32, p. 97-98, 1981.
- TEJERA, F. Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*. *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangelin*. sp. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, v. 13, p. 527-530, 1920.
- VALENÇA-BARBOSA, C. et al. Short report: A common Caatinga cactus, *Pilosocereus gounellei*, is an important ecotope of wild *Triatoma brasiliensis* population in the Jaguaribe Valley of Northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 6, p.1059-1062, 2014.
- VALENÇA-BARBOSA, C. et al. Molecular Identification of Food Sources in Triatomines in the Brazilian Northeast: Roles of Goats and Rodents in Chagas Disease Epidemiology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 5, p. 994-997, 2015.
- VALLEJO, G. A., GUHL, F. & SCHAUB, G. B. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica*, v. 110, n. 2-3, p. 137-47, 2009.
- VARELA-FREIRE, A. A. *A Caatinga Hiperxerófila do Seridó: a sua Caracterização e Estratégias para sua Conservação*. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, São Paulo, 2002.
- VASQUEZ, A. M. et al. Eco-Epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 4, p. 217-222, 2004.
- VENDRAMI, D. P. et al. Mitochondrial PCR-RFLP Assay to Distinguish *Triatoma brasiliensis macromelasoma* from *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Subspecies (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Tropical Medicine*, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- VELLOSO, A. L., SAMPAIO, E. V. S. B. & PAREYN, F. G. C. *Ecorregiões: Propostas para o Bioma Caatinga*. Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, Recife, 2002.
- VINHAES, M. C. & DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16, sup. 2, p.7-12, 2000.
- VINHAES, M. C. et al. Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. *Acta Tropica*, v. 137, p. 105-10, 2014.
- WALTER, A. et al. Risk factors for reinvasion of human dwellings by sylvatic triatomines in northern Bahia State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 3, p. 974-978, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of Chagas' Disease. Technical Report Series 811. Geneva: World Health Organization, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Control of Chagas disease*. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 905, Geneva, 96 pp, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease: control and elimination. Geneva: World Health Organization, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Geneva: World Health Organization, 2015.

XAVIER, S. C. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, p. e2878, 2014.

YA-JIE, J. I., DE-XING, Z. & LI-JUN, H. E. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, v. 3, p. 581-585, 2003

ZINGALES, B. et al. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Tropica*, v. 68, p. :159-173, 1997.

ZINGALES, B. et al. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, Sup. 1, p. 159-64, 1999.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Institutot Oswaldo Cruz*, 2009, v. 104, p. 1051-4, 2009.

ZINGALES, B. et al. *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 240-53, 2012.

ANEXO 1 – Municípios classificados de acordo com a estratificação de risco de transmissão do *Trypanosoma cruzi*.

Risco de transmissão do <i>T. cruzi</i>	Municípios
Alto	Afonso Bezerra, Alexandria, Antônio Martins, Apodi, Barcelona, Campo Grande, Caraúbas, Coronel Ezequiel, Coronel João Pessoa, Doutor Severiano, Encanto, Francisco Dantas, Governador Dix-Sept Rosado, João Dias, Lagoa de Velhos, Lagoa Nova, Lajes Pintada, Lucrecia, Marcelino Vieira, Monte das Gameleiras, Paraná, Pedra Preta, Pilões, Portalegre, Riacho de Santana, Santana do Matos, São Miguel, São Rafael, São Tomé, Serrinha, Serrinha dos Pintos, Severiano Melo, Sítio Novo, Tangará, Upanema, Venha ver.
Médio	Acari, Água Nova, Alto do Rodrigues, Angicos, Assú, Baraúna, Caiçara do Rio dos Ventos, Caicó, Campo Redondo, Caraúba dos Dantas, Carnaubais, Cruzeta, Currais Novos, Equador, Felipe Guerra, Fernando Pedroza, Florânia, Ipanguaçu, Ipueira, Itajá, Itaú, Janduís, Japi, Jardim de Piranhas, Jardim do Seridó, João Câmara, José da Penha, Jucurutu, Lajes, Major Sales, Martins, Messias Targino, Mossoró, Olho D'água dos Borges, Ouro Branco, Paraú, Parelhas, Passa e Fica, Patú, Pau dos Ferros, Pedro Avelino, Pedro Velho, Pendências, Rafael Fernandes, Riacho da Cruz, Riachuelo, Rodolfo Fernandes, Rui Barbosa, Santa Cruz, Santana do Seridó, Santo Antônio, São Fernando, São João do Sabugi, São José de Campestre, São José do Seridó, São Paulo do Potengi, São Vicente, Senador Eloy de Souza, Serra Caiada, Serra do Mel, Serra Negra do Norte, Tabuleiro Grande, Tenente Ananias, Tenente Laurentino, Timbaúba dos Batistas, Umarizal, Viçosa.
Baixo	Almino Afonso, Areia Branca, Arês, Baía Formosa, Bento Fernandes, Boa Saúde, Bodó, Brejinho, Bom Jesus, Caiçara do Norte, Canguaretama, Ceará Mirim, Cerro Corá, Espírito Santo, Extremoz, Frutuoso Gomes, Galinhos, Goianinha, Grossos, Guamaré, Ielmo Marinho, Jaçanã, Jandaíra, Jardim de Angicos, Jundiá, Lagoa D'anta, Lagoa de Pedra, Lagoa Salgada, Luíz Gomes, Macaíba, Macaú, Maxaranguape, Montanhas, Monte Alegre, Natal, Nísia Floresta, Nova Cruz, Parazinho, Passagem, Parnamirim, Pedra Grande, Poço Branco, Porto do Mangue, Pureza, Rafael Godeiro, Rio do Fogo, Santa Maria, São Bento do Norte, São Bento do Trairí, São Francisco do Oeste, São Gonçalo do Amarante, São José de Mipibú, São Miguel do Gostoso, São Pedro, Senador Georgino Avelino, Serra de São Bento, Tibau, Tibau do Sul, Taipú, Touros, Triunfo Potiguar, Várzea, Vera Cruz, Vila Flor.

ANEXO 2 - Amostras de triatomíneos utilizadas para estudos morfológico e taxonômico no estado do Rio Grande do Norte.

Amostras	Espécie	Município/Estado	Ambiente
TbRN 05	<i>T. brasiliensis</i>	Caicó/RN	Peridomicílio
TbRN 08	<i>T. brasiliensis</i>	Caicó/RN	Peridomicílio
TbRN 11	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 13	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 23	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Silvestre
TbRN 79	<i>T. brasiliensis</i>	Severiano Melo/RN	Intradomicílio
TbRN 83	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 89	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Silvestre
TbRN 96	<i>T. brasiliensis</i>	SNN/RN	Silvestre
TbRN 100	<i>T. brasiliensis</i>	SNN/RN	Silvestre
TbRN 110	<i>T. brasiliensis</i>	Caicó/RN	Silvestre
TbRN 127	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Silvestre
TbRN 131	<i>T. brasiliensis</i>	SNN/RN	Peridomicílio
TbRN 132	<i>T. brasiliensis</i>	SNN/RN	Peridomicílio
TbRN 141	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 150	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 156	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 157	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 168	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 173	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 190	<i>T. brasiliensis</i>	Apodi/RN	Peridomicílio
TbRN 192	<i>T. brasiliensis</i>	Severiano Melo/RN	Peridomicílio
TbRN 193	<i>T. brasiliensis</i>	Severiano Melo/RN	Peridomicílio
TbRN 195	<i>T. brasiliensis</i>	GDSR/RN	Peridomicílio
TbRN 196	<i>T. brasiliensis</i>	GDSR/RN	Peridomicílio
TbRN 198	<i>T. brasiliensis</i>	SNN/RN	Silvestre
TbRN 199	<i>T. brasiliensis</i>	SNN/RN	Silvestre
TbRN 206	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Silvestre
TbRN 214	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Silvestre
TbRN 223	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 231	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 250	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TbRN 260	<i>T. brasiliensis</i>	Caraúbas/RN	Peridomicílio
TRN 262	<i>Triatoma</i> sp.	SNN/RN	Silvestre
TRN 263	<i>Triatoma</i> sp.	SNN/RN	Silvestre
TRN 264	<i>Triatoma</i> sp.	SNN/RN	Silvestre
TRN 265	<i>Triatoma</i> sp.	SNN/RN	Silvestre
TRN 266	<i>Triatoma</i> sp.	SNN/RN	Silvestre
TRN 274	<i>Triatoma</i> sp.	Marcelino Vieira	Intradomicílio
TRN 275	<i>Triatoma</i> sp.	SNN/RN	Silvestre

SNN = Serra Negra do Norte; GDSR = Governador Dix Sept Rosado

ANEXO 3 – Espécimes do Complexo *brasiliensis* (MONTEIRO et al., 2004) utilizados na análise das sequências dos triatomíneos deste estudo

Forma cromática	Haplótipo	Cyt b
<i>brasiliensis</i>	c	AY494141
	d	AY494142
	e	AY494143
	h	AY494146
	j	AY494148
	m	AY494151
	n	AY494152
	o	AY494153
	q	AY494155
	t	AY494158
	u	AY494159
	v	AY494160
	<i>macromelasoma</i>	b
g		AY494145
i		AY494147
r		AY494156
z		AY494163
<i>juazeiro</i>	a	AY336524
<i>melanica</i>	H	AY336527
	I	AY494170

ANEXO 4 – Número e percentual dos triatomíneos, por espécie e estágio, capturados no intradomicílio e peridomicílio nos municípios do estado do Rio Grande do Norte entre 2005-2015.

Espécie	Intradomicílio					Peridomicílio					Total	
	Adulto	%	Ninfa	%	Total	Adulto	%	Ninfa	%	Total	Adulto	Ninfa
<i>T. brasiliensis</i>	4.219	58,9	2.861	41,1	7.080	11.215	64,4	6.048	35,6	17.263	15.434	8.909
<i>T. pseudomaculata</i>	2.455	69,1	1.061	30,9	3.516	10.832	62,1	6.394	37,9	17.226	13.287	7.455
<i>P. megistus</i>	10	100	0	0	10	7	100	0	0	7	17	0
<i>T. petrocchiai</i>	50	96,2	2	3,8	52	125	65,8	65	34,2	190	175	67
<i>P. lutzi</i>	174	81,3	40	18,7	214	1.831	78,3	486	21,7	2.308	2.005	526
<i>R. nasutus</i>	106	34,1	205	65,9	311	2.375	69,4	1.008	30,6	3.383	2.481	1.213
<i>R. neglectus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	100	2	0	2
Total	6.705	62,1	4.093	37,9	10.798	25.459	64,6	13.933	35,4	39.392	32.164	18.026

ANEXO 5 – Número anual de ninfas de triatomíneos, por espécie, capturada no intradomicílio dos municípios do estado do Rio Grande do Norte entre 2005-2015.

Espécie de triatomíneos	Ano											Total	%
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015		
<i>T. brasiliensis</i>	548	383	283	253	184	172	122	198	222	214	282	2.861	68,1
<i>T. pseudomaculata</i>	236	142	104	103	58	57	48	85	68	67	93	1.061	25,8
<i>T. petrocchiaie</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
<i>P. lutzi</i>	16	2	3	0	0	2	5	3	5	0	4	40	1,0
<i>P. megistus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>R. nasutus</i>	70	28	19	10	8	2	6	30	8	10	14	205	5,0
Total	861	555	407	357	250	216	167	316	302	289	373	4.093	100

ANEXO 6 – Número anual de ninfas de triatomíneos por espécie, capturadas no peridomicílio dos municípios no estado do Rio Grande do Norte entre 2005-2015.

Espécie de triatomíneos	Ano											Total	%
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015		
<i>T. brasiliensis</i>	900	847	644	586	426	564	232	459	501	425	464	6.048	43,0
<i>T. pseudomaculata</i>	1.149	900	884	637	503	819	204	338	349	296	315	6.394	45,8
<i>T. petrocchiaie</i>	48	7	8	1	1	0	0	0	0	0	0	65	0,05
<i>P. lutzi</i>	77	31	32	23	18	66	11	102	46	38	42	486	3,5
<i>P. megistus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>R. nasutus</i>	156	188	203	70	54	65	20	61	85	38	68	1.008	7,2
Total	2.321	1.973	1.771	1.308	1.002	1.497	453	960	980	795	873	13.933	100

ANEXO 7 – Índice de infecção pelo *T. cruzi* das espécies de triatomíneos capturadas nas unidades domiciliares no estado do Rio Grande do Norte.

Espécie	Índice de infecção anual (%)											Índice de infecção global (%) (infectados/examinados)
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	
<i>T. brasiliensis</i>	2,1	3,1	4,6	3,9	4,5	3,8	1,8	3,2	4,5	3,8	1,4	3,2 (733/22.507)
<i>T. pseudomaculata</i>	1,7	1,1	1,8	0,3	1,8	2,1	3,9	3,1	1,8	0,7	0,9	1,6 (307/19.277)
<i>T. petrocchiae</i>	0	0	0	22,2	0	0	0	0	0	0	0	1,3 (2/150)
<i>P. lutzii</i>	0,4	2,7	3,0	0	0	0,5	0	0	0	0,7	0	0,7 (14/1.937)
<i>P. megistus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0/17)
<i>R. nasutus</i>	1,2	0,8	1,4	0,7	0,8	11,2	4,2	2,9	1,9	0	0,8	1,7 (49/2.915)

ANEXO 8 – Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2016).

BARBOSA-SILVA, Andressa Noronha et al. Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 1, p. 57-67, 2016.

Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil

Andressa Noronha Barbosa-Silva^{[1],[2]}, Antonia Cláudia Jácome da Câmara^{[1],[3]},
Kiev Martins^[1], Daniela Ferreira Nunes^[2], Pedro Igor Câmara de Oliveira^[1],
Paulo Roberto Medeiros de Azevedo^[4], Egler Chiari^[2]
and Lúcia Maria da Cunha Galvão^{[1],[2]}

[1]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. [3]. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. [4]. Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: Natural and artificial ecotope infestation by the *kissing bug* triatomines and their colonization and infection by *Trypanosoma cruzi*, the Chagas disease agent, were evaluated in nine municipalities of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Methods:** Following identification, triatomine intestinal contents were analyzed by direct microscopic examination, xenoculture, and polymerase chain reaction (PCR) for parasite detection. *Trypanosoma cruzi* isolates were genotyped using three different markers. **Results:** Of 842 triatomines captured, 65% were *Triatoma brasiliensis*, 17.8% *Triatoma pseudomaculata*, 12.5% *Panstrongylus lutzi*, and 4.7% *Rhodnius nasutus*. *Triatoma brasiliensis* and *P. lutzi* adults were found in the intradomicile. *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, and *R. nasutus* nymphs and adults were found in the peridomicile and wild environment. Intradomiciliary and peridomiciliary infestation indexes were 5.6% and 33.7%, respectively. In the peridomicile, chicken coops were the most infested ecotope. The *T. cruzi* triatomine infection rate was 30.2%, of which PCR detected 29%. *P. lutzi* (78.1%), *T. brasiliensis* (24.5%), and *T. pseudomaculata* (22.7%) were the most infected species. TcII and III genotypes were detected in *T. brasiliensis* and TcIII in *P. lutzi*. **Conclusions:** *T. brasiliensis* was found in all environments and most ecotopes with high *T. cruzi* infection rates. High infection rates were also detected in *T. pseudomaculata* and *P. lutzi*, suggesting their role in the interchange between the wild and peridomestic transmission cycles. The combination of PCR, microscopic examination, and xenoculture contributed to improving *T. cruzi* infection evaluation in triatomine bugs. The TcII and TcIII genotypes were predominant in the study area.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Triatominae natural infection. PCR. Xenoculture. Direct microscopic examination.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, and its main vectors belong to the genera *Panstrongylus*, *Rhodnius*, and *Triatoma*. Among these blood-sucking reduviid bugs of the subfamily Triatominae, 70 of the over 148 Triatominae species described⁽¹⁾ are naturally infected by *T. cruzi*⁽²⁾. Infection is maintained primarily within three overlapping cycles: domiciliary, peridomiciliary, and sylvatic⁽³⁾. Vector transmission remains the most important route of parasite to human transmission owing to the natural distribution of *T. cruzi* in the triatomine species adapted to domestic or

peridomestic environments; this adaptation to human dwellings strongly determines human infection rates⁽⁴⁾.

The Brazilian Northeast, one of the poorest and most underdeveloped regions within Brazil, is considered the most important region therein for American trypanosomiasis, where native species like *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa and Espínola, 1964, *Panstrongylus lutzi* Neiva & Pinto, 1926, and *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 are widespread^{(5) (6)}. *Triatoma brasiliensis* is distributed in nine Northeast states, Tocantins, and Minas Gerais⁽⁷⁾. Considered the main vector of *T. cruzi* in the Northeastern semiarid regions, it colonizes both sylvatic and domestic environments but is more frequently captured in peridomestic areas^{(5) (8) (9) (10) (11)}. Triatomine control remains problematic as this region is the center of dispersion and has higher *T. brasiliensis* concentrations^{(12) (13) (14)}; it is further aggravated by local vector control activity discontinuation and wild and domestic environmental overlap^{(15) (16) (17)}. *Triatoma pseudomaculata* also demonstrates high domiciliation capacity,

Corresponding author: Dra. Lúcia Maria C. Galvão.

e-mail: galvao@icb.ufmg.br

Received 29 August 2015

Accepted 28 January 2016

thereby increasing its colonization rate in several states^{(5) (18)}; such native triatomines that sporadically invade or reinvade human dwellings further complicate vector control consolidation⁽¹⁸⁾.

Triatomines can be infected with several flagellates and *T. cruzi* infection level evaluation in wild, peridomestic, and domiciliary environments has relevance for control programs aimed at reducing human infections^{(19) (20)}. *Trypanosoma cruzi* has been detected in the excreta or intestinal contents of triatomines by direct microscopic examination (DME)^{(19) (21)}, necessitating the ability to distinguish this protozoan from other trypanosomatids. Although DME is reliable and relatively inexpensive, disadvantages related to sensitivity, specificity^{(22) (23) (24)}, and poor performance on dead insects⁽²⁵⁾ exist. Xenoculture is used for quality control to confirm negative intestinal content results ascertained by DME, whereas positive cultures allow for *T. cruzi* strain isolation⁽²⁶⁾ pursuant to e.g. genetic studies. For detecting *T. cruzi* in reduviid bug feces or urine and mammalian blood samples, polymerase chain reaction (PCR) is generally superior^{(21) (22) (27)} and can also genotype *T. cruzi* using different targets.

Such methodology has increased the rate of positivity of infection in field studies, which is especially important in areas where there is scarce information on vector infection following control and surveillance programs. A recent seroepidemiological survey showed high seroprevalence for municipalities in the west and central mesoregions of the State of Rio Grande do Norte (RN)⁽²⁸⁾, and genotyping studies identified *T. cruzi* I (TcI) in *T. brasiliensis* and TcIII (formerly called TcIIc) in armadillos⁽²⁹⁾, TcI and TcII in humans, TcII and TcIII in *T. brasiliensis*, and TcIII in *P. lutzi*⁽¹⁵⁾.

The purpose of this study was to evaluate the occurrence of triatomine infestation of natural and artificial ecotopes, and the colonization and *T. cruzi* infection in triatomines collected from different environments in the west and central mesoregions of the State RN, Brazil. Diagnostic method efficacy and reproducibility were evaluated and the *T. cruzi* populations isolated from positive triatomines were genotyped to establish their genetic groups.

METHODS

Study area

State of Rio Grande do Norte, located in northeastern Brazil, is divided into 167 municipalities distributed in four mesoregions: West, Central, Agreste, and East. About 90% of the territory represents arid and semiarid climates, where the predominant biome is the Caatinga, characterized as containing thorny shrubs, irregular structure, and partially uncovered soil. This study was conducted in the municipalities of Apodi, Caraúbas, Governador Dix-Sept Rosado, Lucrécia, Mossoró, Severiano Melo, São Miguel, Caicó, and *Serra Negra do Norte* in the West and Central mesoregions (**Figure 1**), which were selected in reference to the seroepidemiological survey conducted between 2007 and 2009⁽²⁸⁾.

Triatomine collection and identification

Triatomines were captured in rural areas of the nine municipalities in intradomicile, peridomicile, and wild environments from March 2009 to August 2012. The intradomiciliary environment was surveyed in 250 domiciliary units (DU) together with 187 artificial structures in the peridomicile such as chicken coops (n = 110), corrals (n = 25), pigsties (n = 2), piles of tiles (n = 44), old stone fence structures (n = 2), and dry carnauba palm tree (*Copernicia prunifera*) straw (n = 4). Entomological indicators were used to calculate the colonization and species peridomiciliary and domiciliary infestation indices⁽³⁰⁾.

Wild environment captures were performed in Apodi, Caraúbas, and *Serra Negra do Norte* in rock outcrops (n = 9), stone fences (n = 2), bird's nests (n = 5), and carnauba palm trees (n = 16), the latter as previously described⁽³¹⁾.

In *Serra Negra do Norte*, wild triatomines capture was conducted at the Seridó Ecological Station (ESEC-Seridó)/ *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio), created by Decree 87222 of 05/31/1982, Law 6902 04.27.1982 as a Conservation Unit. Some adult insects were captured in station lodgings and were classified as an undefined ecotope. Insects were captured both day and night by the principal author with the assistance of the respective Municipal Health Secretariat technicians via manual searches using tweezers and a flashlight in all environments and without the use of insect dislodging substances, and were individually identified as described⁽³²⁾.

Natural infection of triatomine bugs

Direct microscopic examination. Collected triatomines were examined individually and their intestinal content was removed under aseptic conditions and placed in a well of a 24-well plate containing 500µL sterile saline solution. After homogenization, 5µL suspension was used to identify trypanosomatid forms via DME at 400× magnification⁽²⁶⁾ and smear stained by Giemsa (1,000×).

Xenoculture. Approximately 250µL intestinal content suspension was seeded in 15mL tubes containing liver infusion tryptose culture medium⁽³³⁾ plus McNeal Novy Niccole or blood agar and incubated at 28°C. Aliquots were examined after 15, 30, and 60 days by DME (400×)⁽²⁶⁾.

PCR with species-specific primers. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted via phenol-chloroform⁽³⁴⁾ using 200µL diluted insect intestinal content solution (v/v) in 0.2M guanidine-HCl 6M/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)⁽³⁵⁾ maintained for 5-7 days at room temperature and stored at 4°C until DNA extraction. PCR amplifications were performed in duplicate, as described⁽³⁴⁾, using specific primers to identify *T. cruzi*⁽³⁶⁾. PCR assays were performed in a DNA clean chamber to avoid contamination and positive and negative controls were used to monitor each step.

For *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 differential diagnosis, multiplex PCR was performed

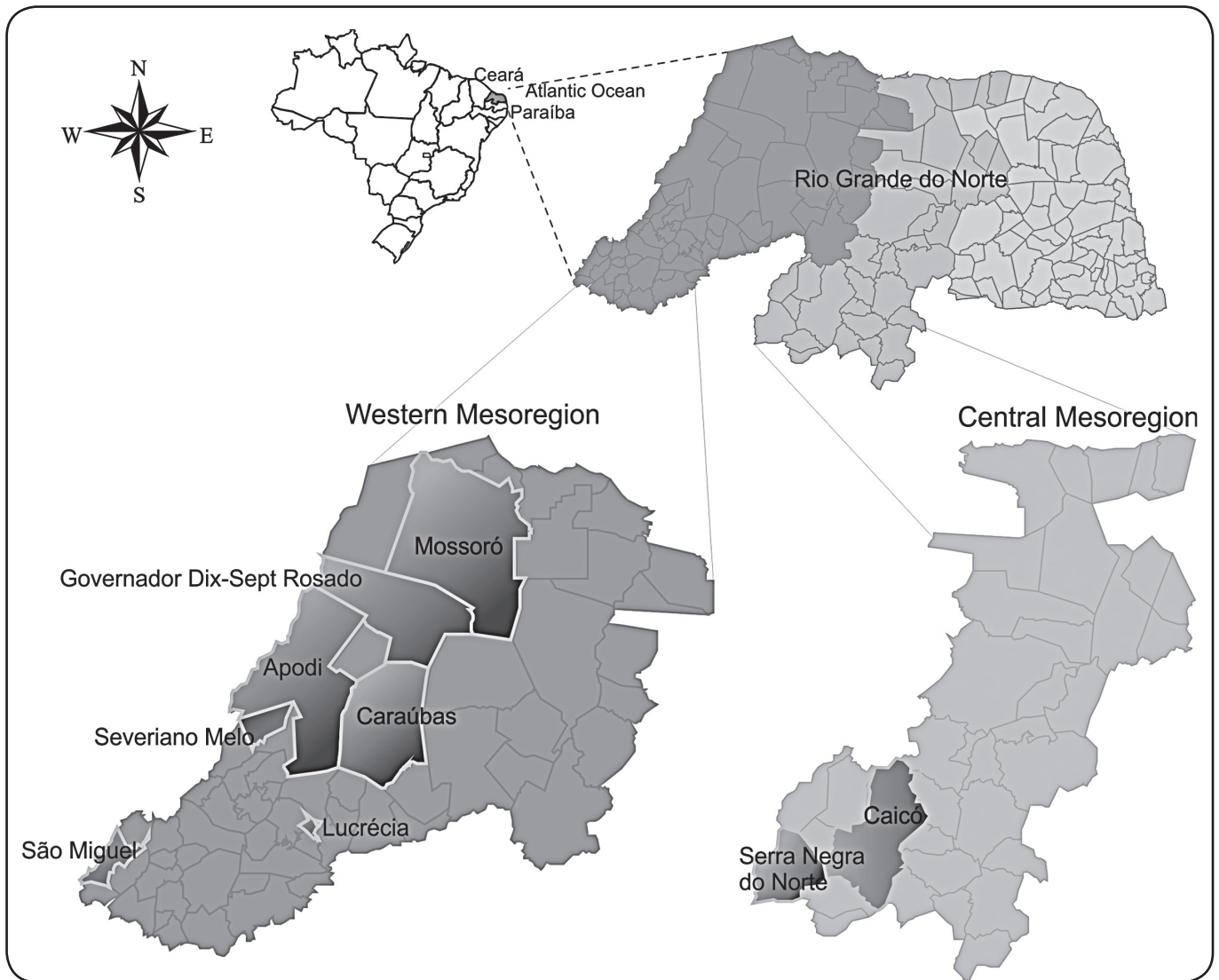


FIGURE 1 - Map of the State of Rio Grande do Norte highlighting the West and Central mesoregions. The study area showing the surveyed municipalities is shown in dark grey.

as described⁽³⁷⁾. As positive controls, *Trypanosoma cruzi* cell cultures of the Colombian strains (*T. cruzi* I), JG (*T. cruzi* II), and *T. rangeli* were used.

Trypanosoma cruzi isolates for genotyping

Cultured parasite genomic DNA obtained using phenol-chloroform was used as PCR assay templates⁽³⁸⁾. *Trypanosoma cruzi* isolates were typed using three different parasite genomic sequences as reported⁽³⁹⁾, with the 24S α ribosomal (rRNA) gene D7 domain⁽⁴⁰⁾, mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2 gene (COII)⁽⁴¹⁾, and the spliced leader genes intergenic region⁽⁴²⁾ as markers for six discrete typing units (DTUs)⁽⁴³⁾, using *T. cruzi* reference strains⁽¹⁵⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾ and clones⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾ as DTU controls.

All PCR products were analyzed by 6% polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by silver staining⁽⁴⁸⁾.

Statistical analysis

To quantify the concordance between the results of different methods, generalized Kappa (*hat k*) coefficients were estimated and an approximate 95% confidence interval (CI_{95%}) for *k* [lower confidence limit (LCL) and upper confidence limit (UCL)]⁽⁴⁹⁾ was calculated and classified accordingly⁽⁵⁰⁾.

RESULTS

Table 1 shows that were captured 842 triatomines including *T. brasiliensis* (65%), *T. pseudomaculata* (17.8%), *P. lutzi* (12.5%), and *R. nasutus* (4.7%). *T. brasiliensis* was predominant in intradomicile (*n* = 12), peridomicile (*n* = 323), and wild environments (*n* = 212). **Table 1** shows specimen numbers per species, environment, and municipality.

TABLE 1 - Number of triatomine bugs captured in different environments in the west and central mesoregions in nine municipalities in the State of Rio Grande do Norte, Brazil (2009-2012).

Municipalities	Triatomine species								Total	
	<i>Triatoma brasiliensis</i>		<i>Triatoma pseudomaculata</i>		<i>Panstrongylus lutzi</i>		<i>Rhodnius nasutus</i>			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Central mesoregion										
Caicó	23	4.3	0	0.0	0	0.0	1	2.5	24	2.9
Serra Negra do Norte	127	23.2	38	25.3	102	97.1	0	0.0	267	31.8
West mesoregion										
Apodi	35	6.4	20	13.3	0	0.0	21	52.5	76	9.0
Caraúbas	303	55.4	65	43.4	3	2.9	18	45.0	389	46.2
Governador Dix-Sept	50	9.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	50	5.9
Rosado										
Lucrécia	0	0.0	7	4.7	0	0.0	0	0.0	7	0.8
Mossoró	4	0.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	0.5
São Miguel	1	0.1	12	8.0	0	0.0	0	0.0	13	1.5
Severiano Melo	4	0.7	8	5.3	0	0.0	0	0.0	12	1.4
Total	547	65.0	150	17.8	105	12.5	40	4.7	842	100.0
Environments Wild										
nymphs	89	42.0	16	27.5	0	0.0	6	33.3	111	28.5
adults	123	58.0	42	72.5	102	100.0	12	66.7	279	71.5
Peridomicile										
nymphs	200	61.9	54	58.6	0	0.0	9	40.9	263	60.2
adults	123	30.1	38	41.4	0	0.0	13	59.1	174	39.8
Intradomicile										
nymphs	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
adults	12	100.0	0	0.0	3	100.0	0	0.0	15	100.0

In the wild, 48.5% (16/33) of the ecotopes were infested by triatomines. High infestation was observed in stone fences (100%) and rock outcrops (75%) in *Serra Negra do Norte* in comparison with other ecotopes. In the peridomicile, the infestation index was 33.7% (63/187) with *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* at indices at 26.2% (49/187) and 5.9% (11/187), respectively, primarily in chicken coops. The intradomicile infestation index was 5.6% (14/250). **Table 2** shows the colonization index of each ecotope by triatomine species.

All the insects were examined; 30.2% exhibited *T. cruzi* infection, with *P. lutzi* demonstrating the highest rates (78.1%). The highest infection rate was detected by PCR (29%), detecting *T. cruzi* infection in most *P. lutzi* (69.5%) and *T. brasiliensis* (24.3%) specimens (**Figure 2A**). Kappa evinced no agreement between *T. cruzi* detection methods for *T. brasiliensis* [*hat k* = -0.0112; $CI_{95\%}$ = (-0.0596; 0.0372)], *T. pseudomaculata* [*hat k* = 0.0036; $CI_{95\%}$ = (-0.0888; 0.0960)], *P. lutzi* [*hat k* = 0.0690; $CI_{95\%}$ = (-0.0414; 0.1794)], and *R. nasutus* (*hat k* = 0.1652; $CI_{95\%}$ = (-0.0137; 0.3441)]. The global infection index was 0.12 [$CI_{95\%}$ = (0.0773; 0.1553)] indicating slight methodological agreement, but significantly different from zero as excluded by the CI.

Figure 2B shows that the highest infected specimen rate (53.3%) occurred in the intradomicile [primarily *P. lutzi* (66.7%)], followed by the wild environment (40.5%) and peridomicile (20.1%) [primarily *P. lutzi* and *T. pseudomaculata* (78.4% and 27.2%, respectively)].

In the wild, *T. brasiliensis* presented high infection indices in *Serra Negra do Norte* (31.4%) and Caraúbas (26.1%) rock outcrops. *T. cruzi* infection was also detected in *R. nasutus* in carnauba palm trees. In the peridomicile, *T. brasiliensis* presented high infection indexes in piles of tiles (38.1%) and corrals (37.5%) in Governador Dix Sept Rosado and Caraúbas, respectively, and *T. pseudomaculata* in chicken coops (30.8%) in Caraúbas (**Table 2**).

Intestinal contents of all infected triatomines and 100 uninfected specimens were submitted to multiplex PCR using primers for *T. rangeli* and produced no overlapping data, thus confirming that *T. cruzi*-specific amplification.

Trypanosoma cruzi DTUs were identified in 15 samples from three municipalities. We isolated 3 TcII and 3 TcIII stocks from *T. brasiliensis* captured in Caicó and *Serra Negra do Norte*, respectively, and 9 TcIII *T. cruzi* were isolated from *P. lutzi* in Caraúbas (**Table 3**).

TABLE 2 - Entomological indicators observed in the ecotopes of different environments in the municipalities of the State of Rio Grande do Norte.

Ecotopes	Infested ecotopes %	<i>Triatoma brasiliensis</i> %			<i>Triatoma pseudomaculata</i> %			<i>Panstrongylus lutzi</i> %			<i>Rhodnius nasutus</i> %			
		II	CI	NII	II	CI	NII	II	CI	NII	II	CI	NII	
Wild environment														
Apodi														
bird nests	20.0	0.0	0.0	0.0	20.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
carnauba palm trees	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Caraúbas														
carnauba palm trees	42.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	42.8	33.3	16.7	
rock outcrops	60.0	60.0	33.3	26.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
<i>Serra Negra do Norte</i>														
rock outcrops	75.0	75.0	100.0	31.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
stone fences	100.0	100.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ecological station lodging	100.0	100.0	0.0	68.7	100.0	0.0	23.7	100.0	0.0	78.4	0.0	0.0	0.0	
Total	48.5	27.2	31.2	31.1	6.0	6.2	15.5	3.0	0.0	78.4	18.2	21.4	16.7	
Peridomicile														
Apodi														
corrals	22.2	22.2	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
carnauba palm tree straw	66.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	100.0	4.8	
chicken coops	13.3	13.3	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
piles of tiles	20.0	20.0	100	22.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Caicó														
stone fences	100.0	100.0	100	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
chicken coops	10.0	10.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
carnauba palm tree straw	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	
Caraúbas														
corrals	31.2	31.2	80.0	37.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
chicken coops	67.5	52.5	100.0	12.1	15.0	100.0	30.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
pigsties	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
piles of tiles	38.9	38.9	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Governador Dix-Sept Rosado														
chicken coops	33.3	33.3	100.0	37.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
piles of tiles	60.0	60.0	100.0	38.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Lucrécia														
chicken coops	20.0	0.0	0.0	0.0	20.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Mossoró														
chicken coops	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
São Miguel														
chicken coops	40.0	20.0	0.0	0.0	20.0	100.0	41.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
<i>Serra Negra do Norte</i>														
chicken coops	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
piles of tiles	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Severiano Melo														
chicken coops	57.1	42.8	0.0	0.0	14.3	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Total	33.7	26.2	73.0	19.2	5.9	15.9	27.1	0.0	0.0	0.0	0.5	1.6	4.5	

Continue...

TABLE 2 - Continuation.

Ecotopes	Infested ecotopes %	<i>Triatoma brasiliensis</i> %			<i>Triatoma pseudomaculata</i> %			<i>Panstrongylus lutzi</i> %			<i>Rhodnius nasutus</i> %		
		II	CI	NII	II	CI	NII	II	CI	NII	II	CI	NII
Intradomicile													
Apodi	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Caicó	10.7	10.7	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Caraúbas	8.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	0.0	66.7	0.0	0.0	0.0
Governador Dix-Sept Rosado	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lucrécia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mossoró	12.0	12.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
São Miguel	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Serra Negra do Norte</i>	18.7	18.7	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Severiano Melo	5.9	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	5.6	4.4	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	66.7	0.0	0.0	0.0

II: infestation index; CI: colonization index; NII: natural infection index.

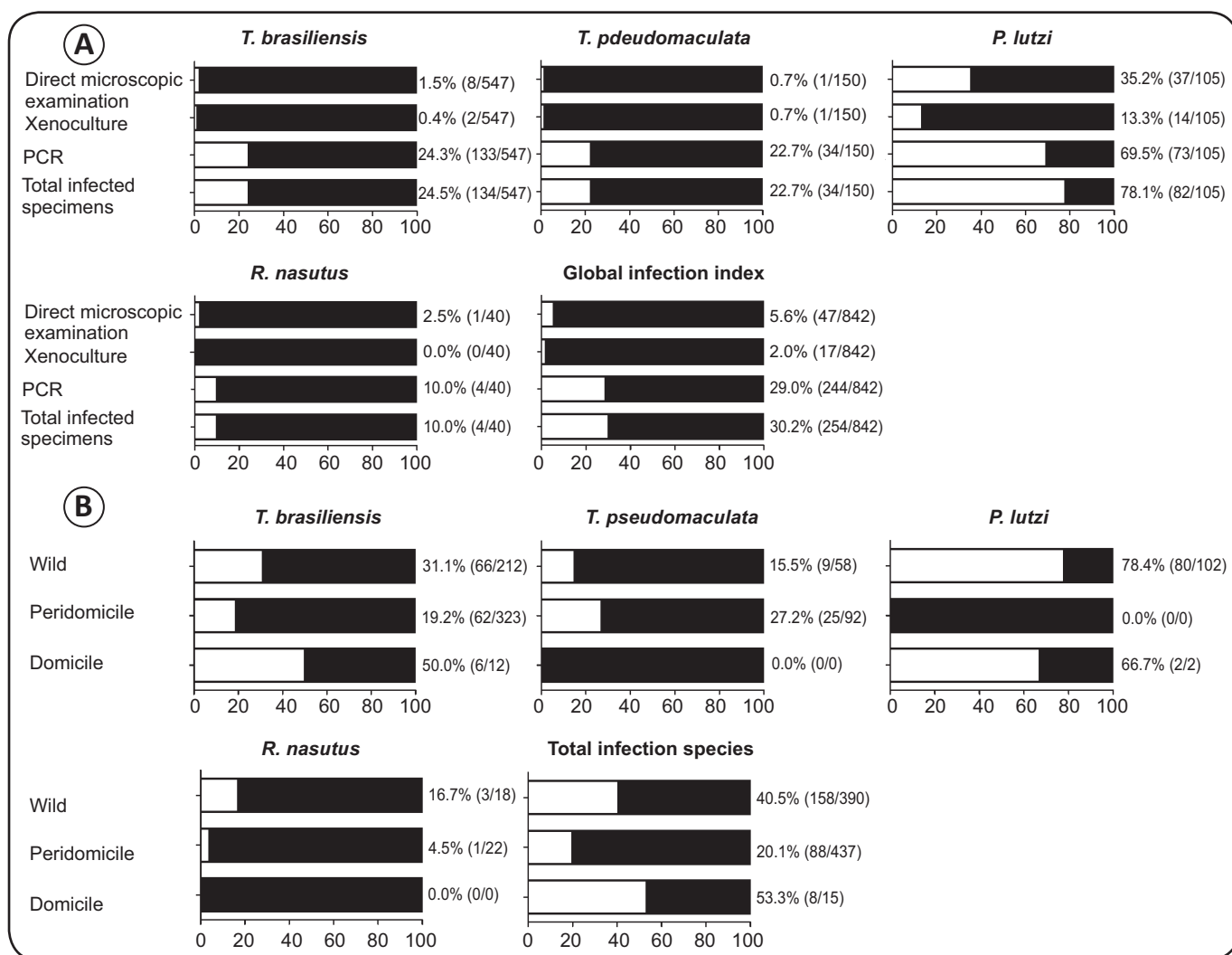


FIGURE 2 - Rate of natural infection of triatomine species by *Trypanosoma cruzi* as determined using different methods and in three distinct environments. A) Infection rate of triatomine species by detection method and global infection index. B) Infection rate of triatomines in different capture environments and total number of infected specimens. *T. brasiliensis*: *Triatoma brasiliensis*; *T. pseudomaculata*: *Triatoma pseudomaculata*; *P. lutzi*: *Panstrongylus lutzi*; *R. nasutus*: *Rhodnius nasutus*; PCR: polymerase chain reaction.

TABLE 3 - Geographical origin, development stage, environment, and genetic typing of *Trypanosoma cruzi* stocks from triatomine species.

<i>Trypanosoma cruzi</i> stocks	Triatomine species	Stage	Environment	DTU	Municipality
RN01	<i>Triatoma brasiliensis</i>	nymph	peridomiciliary	TcII	Caicó
RN02	<i>Triatoma brasiliensis</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN03	<i>Triatoma brasiliensis</i>	adult	wild	TcII	Serra Negra do Norte
RN04	<i>Triatoma brasiliensis</i>	nymph	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN05	<i>Triatoma brasiliensis</i>	nymph	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN06	<i>Triatoma brasiliensis</i>	nymph	wild	TcII	Serra Negra do Norte
RN07	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN08	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN09	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN10	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN11	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN12	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN18	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	intradomiciliary	TcIII	Caraúbas
RN19	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	intradomiciliary	TcIII	Caraúbas
RN213	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
RN812	<i>Panstrongylus lutzi</i>	adult	wild	TcIII	Serra Negra do Norte
CoH.7G2 ^{*(47)}	human	-	-	TcI	-
JG ^{*(44)}	human	-	-	TcII	-
RN19 ^{*(15)}	human	-	-	TcIII	-
AM64 ^{*(45)}	human	-	-	TcIV	-
3253*	human	-	-	TcV	-
CL Brener ^{*(46)}	<i>Triatoma infestans</i>	-	-	TcVI	-

DTU: discrete typing units: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV and TcVI. **T. cruzi* strains and clones used as reference; 3253: Lages-Silva et al. (unpublished data).

DISCUSSION

This general assessment of triatomine occurrence demonstrated that the species *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. lutzi*, and *R. nasutus* continue to exist in artificial environments in RN State municipalities, where they have been registered since the 1950s^{(7) (8) (14) (15) (51) (52)} and where high seroprevalence of human *T. cruzi* infection has been estimated⁽²⁸⁾. The presence of other triatomine species has also been reported^{(5) (7) (8) (52)}, but these were not found in this study.

Triatoma brasiliensis and *Triatoma pseudomaculata* were found in most municipalities as expected, being the main species caught in the semiarid RN region. *R. nasutus* was captured only in Apodi, Caraúbas, and Caicó municipalities and *P. lutzi* was found only in Serra Negra do Norte and in Caraúbas, as described⁽⁵¹⁾. In agreement with our studies, *T. brasiliensis* was the most frequently identified species, followed by *T. pseudomaculata* and *R. nasutus*, as observed in several studies^{(9) (53)}.

We identified *T. brasiliensis* in the wild environment, peridomicile, and intradomicile with high *T. cruzi* infection rates. This species has been reported as semi-domestic, since it is an autochthonous species capable of colonizing domiciles and the peridomicile⁽¹²⁾. It is highly dispersed and frequent owing to its eurytopic characteristics, is not hygrophilous, is able to withstand very high temperatures, and thus is acclimatized to the vast expanse of the Northeastern region⁽¹³⁾.

Despite the absence of intradomicile colonies, frequent adult *T. brasiliensis* invasions occur because of the proximity of the wild environment with DUs. Residential lighting attracts these insects⁽⁵⁴⁾, potentially explaining their localized capture. Peridomicile colonization was observed by *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* nymphs, most frequently in chicken coops where they develop dense colonies, facilitating intradomiciliary invasion. *T. brasiliensis* was also found in piles of tiles, corrals, and associated with domestic and synanthropic animals, according to municipality. This species strongly associates with native rodents, especially *Galea* spp., which thrive

around rural dwellings in this state⁽⁵⁵⁾. The epidemiological profile similarities among the municipalities studied suggest the need for interventions to prevent parasite transmission in this environment to domestic animals and humans.

Degradation of the natural wild vector habitat allows the bugs to move close to human habitations; such coexistence increases the probability of human infection⁽⁵⁶⁾. In the wild, *T. brasiliensis* was mainly found colonizing rocky outcrops and stone fences. Its occurrence in Northeastern Brazil is associated with rock formation distribution⁽⁶⁾. However, this species can also be found in shrubby cacti co-occupied by native rodents in Ceará⁽⁵⁷⁾.

Triatoma pseudomaculata is widely distributed in the wild and is considered to be difficult to control⁽⁵⁾. *T. pseudomaculata* is primarily associated with Caatinga and areas of the Cerrado in Brazil⁽⁵⁸⁾, and is an arboricolous species⁽⁵⁹⁾. Here, the natural habitat of *T. pseudomaculata* was identified as bird's nests, corroborating previous findings⁽³²⁾.

In the study area, the natural *R. nasutus* habitat was the Carnauba palm, considered the major ecotope of this species⁽⁹⁾⁽⁶⁰⁾. Colonization foci were observed in the peridomicile in dry carnauba straw used by the rural population to manufacture household items in Apodi. This can be explained by the proximity of palm trees with DUs that attract insects as previously described or by passive insect transport by residents living in carnauba extraction areas, where storing dry leaves in the peridomicile is common. In the State of Ceará, *R. nasutus* has been frequently found colonizing the peridomicile owing to the use of carnauba straw for chicken coop roof construction and household goods manufacture⁽⁹⁾⁽⁶¹⁾.

Panstrongylus lutzi was the most infected species in the intradomicile and wild environment. The former is worrying because of the *T. cruzi* transmission risk to domestic animals and humans and potential introduction of a new parasite genetic group into the transmission cycles, since this area is currently exclusively infected with DTU III⁽¹⁵⁾. *P. lutzi* has restricted distribution in areas of the semiarid northeast although it has wide geographical distribution and a high *T. cruzi* infection rate in the State of Pernambuco. Its domiciliation has occurred in the States of Ceará and Pernambuco⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾. *P. lutzi* is found in hollow *Auxemma oncoalyx* trunks in Ceará⁽⁶⁴⁾ and in armadillo burrows in the semiarid Caatinga in Bahia⁽⁵⁹⁾. However, the *P. lutzi* natural habitat was not identified despite extensive searching in the wild environment of the Seridó Ecological Station where most specimens were captured; thus, further studies are required⁽¹⁵⁾⁽⁵¹⁾.

Currently, vector transmission is considered residual by a few native and peridomestic species such as *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*. There is also a risk of progressive domiciliation of certain species previously considered sylvatic such as *P. lutzi* and the possibility of human infection directly related to the parasite enzootic cycle⁽⁶²⁾. *P. lutzi* holds relevance toward maintaining the peridomestic and domestic *T. cruzi* transmission cycles, the risk of invasion and eventual colonization therein, and the consequent parasite transmission to domestic animals and humans. These results highlight the

increasing epidemiological importance of *P. lutzi* and indicate the continuing necessity of maintaining epidemiological surveillance against *T. cruzi* transmission in the study area.

Here, we reported a slight agreement among *T. cruzi* detection methods used to evaluate infection in triatomines, and the importance of its association to field studies. *T. cruzi* infection varied among triatomine species according to method with PCR showing high positivity whereas detection by DME in intestinal contents was low. However, higher infection rates were reported with flagellates morphologically similar to *T. cruzi* in Pernambuco⁽⁶³⁾, and similar or higher triatomine infection rates have been reported between methods⁽¹⁹⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾. High PCR positivity in relation to DME has been previously observed, indicating its utility for epidemiological studies⁽¹⁹⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽⁶⁵⁾. PCR can also directly detect *T. cruzi* vector infection thus improving triatomine evaluation and should be used to assess infection rates in dead insects⁽²⁵⁾ owing to its higher relative degree of precision. Thus, PCR represents the best tool for parasite detection, confirming the majority of infections ascertained by DME and xenoculture. However, these remain useful as the combination of methods can contribute to monitoring *T. cruzi* in triatomines and enhance confidence regarding triatomine positivity.

The *Trypanosoma cruzi* DTUs identified in 15 isolates from triatomine bugs were TcII and TcIII in *T. brasiliensis* and TcIII in *P. lutzi*. Previous findings showed these DTUs circulating in these species in the semiarid zone of RN⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾ and highlight the need to understand *T. cruzi* population distribution in this area. Naturally heterogeneous *T. cruzi* populations involving TcI, TcII, and TcIII circulate among humans and triatomines in three different municipalities without domicile colonization⁽¹⁷⁾, and high genetic similarities exist among *T. cruzi* populations circulating in different hosts, localities, and environments⁽¹⁶⁾. TcII was detected in the peridomicile in Caicó and in the wild in *Serra Negra do Norte*, indicating its participation in sylvatic and peridomestic cycles. The original primary host of TcII appears to be primates. Whereas its ecological niche has yet to be determined, isolates have been described from opossums in the Atlantic forest and from sylvatic primates, suggesting that such primates might be the primary original mammalian host⁽⁶⁶⁾. TcII has also been isolated from the armadillo *Euphractus sexcinctus* in the Paraguayan Chaco⁽⁶⁷⁾. This DTU has been shown as the primary cause of severe acute and chronic Chagas disease in the Atlantic Forest and central region of Brazil and represents the etiological disease agent in São Felipe in the State of Bahia, where the domestic vector is *P. megistus*⁽⁶⁷⁾.

TcIII was isolated from *T. brasiliensis* in the wild environment and from *P. lutzi* captured in the domiciliary and wild environments of two different localities. TcIII is a poorly understood *T. cruzi* genetic group predominantly identified among wild cycles of parasite transmission infecting terrestrial mammals and triatomine vectors, but is also a potentially important emergent human disease agent⁽⁶⁸⁾. A few triatomine species have been described in sylvatic TcIII transmission such as *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, and *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843, both mainly sylvatic vectors frequently associated with terrestrial ecotopes⁽⁶⁹⁾. TcIII is found

in a broad range of terrestrial mammals and its transmission may occur inside triatomine-infested burrows by both vectorial and oral routes^{(29) (70)}. Overlapping geographic areas of TcIII and TcI isolates occur across South America, with shared wild mammals and vectors in terrestrial ecotopes⁽²⁹⁾. TcIII in domestic transmission cycles, while intermittent⁽⁶⁸⁾, implies a role as a human disease agent. Furthermore, TcIII may be under-reported in both domestic and sylvatic transmission cycles because some typing methodologies fail to distinguish between TcIV and TcIII⁽⁷¹⁾. The TcII and TcIII identified in this study corroborate previous findings and reinforce the need for constant epidemiological surveillance of *T. brasiliensis* and *P. lutzi* to prevent TcIII spread to the domestic cycle⁽¹⁵⁾.

TcI was not detected in triatomines in the studied area. However, most studies conducted in northeastern Brazil have isolated this DTU from *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*, with most naturally infected *T. brasiliensis* isolates being TcI⁽⁷²⁾. TcI has also been identified in *T. pseudomaculata* and *R. nasutus* in the peridomicile and natural environments of five State of Ceará peri-urban and urban localities⁽⁷³⁾. Therein, high TcI and TcII infection rates were detected in peridomestic *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*, respectively⁽⁷⁴⁾. TcI has been most frequently identified in triatomines of the State of Mato Grosso do Sul⁽⁷⁵⁾. The majority of isolates from humans, reservoirs, and vectors from Amazonia correspond to TcI⁽²⁹⁾ and it has been detected in humans from State of RN^{(15) (16)}, with recent isolates from patients with various clinical forms of Chagas disease⁽¹⁷⁾. *T. cruzi* genotypes isolated from triatomines can vary according to vector-specific physiology and ecological habitat⁽⁴³⁾, highlighting the necessary to accurately identify TcI in triatomines.

Our results suggest that combining methodologies contributed to increased parasite detection and to identifying infection foci to precisely determine triatomine distribution. Despite low parasite detection via xenoculture and DME, these methods allow the isolation of *T. cruzi* for further study. Owing to high peridomestic ecotope infestation and high *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* *T. cruzi* infection, we recommend efficient entomological surveillance programs to detect possible colonization. This study contributes to our knowledge of *T. cruzi* diagnosis and identification in field-collected triatomines, further demonstrating that *T. cruzi* II and III predominate in the study area and, with future research, are essential for vector control and human infection prevention.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Secretariat of State for Public Health of Rio Grande do Norte, represented by the health authorities and agents of the Municipal Secretaries of the West and Central mesoregions for their indispensable support of the survey field activities. The authors are also grateful to Adalberto Antonio Varela-Freire MSc (*in memoriam*) and Philip S.P. Badiz for critical reading and revision of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by research grants from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* MCT/CNPq number 472251/2010-4 (EC); MCTI/CNPq/MS-SCTIE-Decit number 404056/2012-1 (LMCG); *Programa Nacional de Incentivo à Parasitologia Básica*/CAPES number 23038.005288/2011-48 (ACJC); research fellowships from the CNPq (LMCG and EC), and a scholarship from CAPES (ANBS).

REFERENCES

- Galvão C, Paula AS. Sistemática e evolução dos vetores. In: Galvão C, editor. Vetores da doença de Chagas. Curitiba (PR): Sociedade Brasileira de Zoologia 2015. p. 26-31.
- Zeledón R, Rabinovich JE. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol* 1981; 26:101-133.
- Deane LM. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Bras Malariol D Trop* 1964; 16:27-48.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 2010; 115:5-13.
- Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern region, Brazil. *Cad Saude Publica* 2000; 16:13-34.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med* 2012; 2012:705326.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/1983, no Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 1984; 36:15-32.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, et al. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 443-449.
- Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:263-270.
- Almeida CE, Pacheco RS, Haag K, Dupas S, Dotson EM, Costa J. Inferring from the *Cyt B* gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78:791-802.
- Carbajal de la Fuente AL, Dias-Lima A, Lopes CM, Emperaire L, Walter A, Ferreira A, et al. Behavioral plasticity of Triatominae related to habitat selection in Northeast Brazil. *J Med Entomol* 2008; 45:14-19.
- Forattini OP. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domicile dispersal in Brazil. *Rev Saude Publica* 1980; 14:265-299.

13. Alencar JE. História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará, Imprensa Universitária, Fortaleza, CE, p. 341, 1987.
14. Silveira AC, Vinhaes MC. Chagas disease: the epidemiological and control aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31:15-60.
15. Câmara ACJ, Varela-Freire AA, Valadares HMS, Macedo AM, D'Ávila DA, Machado CR, et al. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop* 2010; 115:205-211.
16. Câmara ACJ, Lages-Silva E, Sampaio GHF, D'Ávila DA, Chiari E, Galvão LMC. Homogeneity of *Trypanosoma cruzi* I, II, and III populations and the overlap of wild and domestic transmission cycles by *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil. *Parasitol Res* 2013; 112:1543-1550.
17. Martins K, Andrade CM, Barbosa-Silva AN, Nascimento GB, Chiari E, Galvão LMC, et al. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis* 2015; 39:68-75.
18. Silveira AC. New challenges and the future of control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44 (supl 2):122-124.
19. Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:649-651.
20. Botto-Mahan C, Ortiz S, Rozas M, Cattán PE, Solari A. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:237-239.
21. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1477-1482.
22. Russomando G, Rojas AA, Almiron M, Figueredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 1996; 83:62-66.
23. Braz LMA, Raiz-Jr R, Amato-Neto V, Alárcon RS, Gakyia E, Okay TS. The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: comparison of a PCR-based assay with microscopical examination. *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101:461-465.
24. Pizarro JC, Lucero DE, Stevens L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia. *BMC Infect Dis* 2007; 7:66-73.
25. Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, et al. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:740-745.
26. Bronfen E, Rocha FSA, Machado GBN, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84:237-240.
27. Brenière SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:335-341.
28. Brito CRN, Sampaio GHF, Câmara ACJ, Nunes DF, Azevedo PRM, Chiari E, et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:346-352.
29. Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira ACV, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCHc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol* 2009; 9:1265-1274.
30. World Health Organization (WHO). Control of Chagas' Disease. Technical Report Series 811. Geneva: WHO; 1991.
31. Diotaiuti L, Dias JCP. Occurrence and biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in palm trees of suburban areas of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79:293-301.
32. Carcavallo RU, Rodríguez MEF, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock IS, Galvão C, et al. Habitats and related fauna. In: Carcavallo RU, Galindéz-Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas. Vol II Rio de Janeiro (RJ): FIOCRUZ; 1998. p. 561-600.
33. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I - Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop* 1964; 6:93-100.
34. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SDJ, Galvão LMC, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998; 88:28-33.
35. Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48:211-222.
36. Degraeve W, Fragoso SP, Britto C, Van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MAB, et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27:63-70.
37. Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999; 91:306-314.
38. Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SDJ. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 55:147-153.
39. D'Ávila DA, Macedo AM, Valadares HMS, Gontijo ED, Castro AM, Machado CR, et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1718-1725.
40. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62:45-52.
41. Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Pathog* 2006; 2:e24.
42. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HMS, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 2007; 37:1319-1327.
43. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:1051-1054.
44. Lages-Silva E, Crema E, Ramírez LE, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:435-441.
45. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJO, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One* 2012; 7:e41284.

46. Zingales B, Pereira MES, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, et al. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop* 1997; 68:159-173.
47. Federici EE, Abelmann WH, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13:272-280.
48. Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Gene* 1993; 90:655-656.
49. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3rded. Hoboken: Wiley; 2003.
50. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-174.
51. Lucena DT. Doença de Chagas no Nordeste. *Rev Bras Malariol D Trop* 1959; 11:675-696.
52. Castro-Filho J, Silveira AC. Distribuição da Doença de Chagas no Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 1979; 31:85-89.
53. Coutinho CFS, Souza-Santos R, Teixeira NFD, Georg I, Gomes TF, Boia MN, et al. An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the state of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cad Saude Publica*, 2014; 30:785-793.
54. Freitas SPC, Freitas ALC, Prazeres SM, Gonçalves TCM. Influence of anthropic habits in the dispersion of *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espinola, 1964 through *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) in the State of Ceará, Brazil. *Cad Saude Publica* 2004; 20:333-336.
55. Valença-Barbosa C, Lima MM, Sarquis O, Bezerra CM, Franch-Abad F. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect II: Drivers of site-occupancy by synanthropic *Triatoma brasiliensis* in the Brazilian Northeast. *PLoS Negl Trop Dis* 2014a; 8:e2861.
56. Toledo MJO, Kühl JB, Silva SV, Gasperi V, Araújo SM. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. *Rev Saude Publica* 1997; 3:197-203.
57. Valença-Barbosa C, Lima MM, Sarquis O, Bezerra CM, Franch-Abad F. Short report: A common Caatinga cactus, *Pilosocereus gounellei*, is an important ecotope of wild *Triatoma brasiliensis* population in the Jaguaribe Valley of Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2014b; 90:1059-1062.
58. Carbajal de la Fuente AL, Porcasi X, Noireau F, Diotaiuti L, Gorla DE. The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae) with environmental variables recorded by remote sensors. *Infect Genet Evol* 2009; 9:54-61.
59. Dias-Lima AG, Menezes D, Sherlock I, Noireau F. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). *J Med Entomol* 2003; 40:989-990.
60. Lima MM, Coutinho CFS, Gomes TF, Oliveira TG, Duarte R, Borges-Pereira J, et al. 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* 2008; 79:750-754.
61. Sarquis O, Sposina R, Oliveira TG, Mac Cord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J, et al. Aspects of peridomiciliary ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:143-147.
62. Silveira AC, Dias JCP. The control of vectorial transmission. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44:52-63.
63. Silva MBA, Barreto AVMS, Silva HA, Galvão C, Rocha D, Jurberg J, et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the State of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma* infection rates between 2006 and 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:60-65.
64. Garcia MHHM, Souza L, Souza RCM, Paula AS, Borges EC, Barbosa SE, et al. Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceará, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:410-415.
65. Cominetti MC, Almeida RFC, Gonçalves GMA, Andreotti R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46:277-280.
66. Lisboa CV, Mangia RH, De Lima NRC, Martins A, Dietz J, Baker AJ, et al. Distinct patterns of *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* in distinct Atlantic coastal rainforest fragments in Rio de Janeiro - Brazil. *Parasitology* 2004; 129:703-711.
67. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 2009; 136:1509-1528.
68. Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3:e510.
69. Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95:557-565.
70. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural host of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 2005; 35:225-233.
71. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira ACV, et al. 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* 1998; 58:807-811.
72. Pacheco RS, Brito CMM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genet* 2005; 43:519-530.
73. Brito CMM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CFS, Duarte R, et al. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 2008; 103:1111-1117.
74. Gumiel M, da Mota FF, Rizzo VS, Sarquis O, de Castro DP, Lima MM, et al. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit Vectors* 2015; 8:245.
75. Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47:747-755.