



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TATIENE ROSSANA MÓTA SILVA

**Distribuição espacial e caracterização molecular das
linhagens de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos em municípios do
Agreste de Pernambuco**

Recife

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TATIENE ROSSANA MÓTA SILVA

**Distribuição espacial e caracterização molecular das
linhagens de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos em municípios do
Agreste de Pernambuco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586d Silva, Tatiene Rossana Móta
Distribuição espacial e caracterização molecular das linhagens de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos em municípios do Agreste de Pernambuco / Tatiene Rossana Móta Silva. - 2022.
139 f. : il.
- Orientadora: Gilcia Aparecida de Carvalho.
Coorientador: Rafael Antonio do Nascimento Ramos.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.
1. Vetores. 2. Doença de Chagas. 3. DTUs. 4. Tripanosomatídeos. I. Carvalho, Gilcia Aparecida de, orient. II. Ramos, Rafael Antonio do Nascimento, coorient. III. Título

CDD 636.089

TATIENE ROSSANA MÓTA SILVA

**Distribuição espacial e caracterização molecular das linhagens de
Trypanosoma cruzi em triatomíneos em municípios do Agreste de Pernambuco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Data da aprovação: 28 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Profa. Dra. Valéria Cerqueira Duarte
Universidade Federal do Pará/Campus Castanhal

Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Lêucio Câmara Alves
Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Medicina Veterinária

Dr. Edyniesky Ferrer Miranda
Universidade Federal de Pernambuco/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

*Ao meu filho, Isaac M3ta Freire Rodrigues, amor da minha vida,
fonte de todo o est3mulo e de for7a para continuar.*

Agradecimentos

A Deus por seu auxílio, proteção e por guiar todos os meus passos.

À Nossa Senhora por sua proteção e amparo todos os dias de minha vida.

À minha mãe, Maria de Lourdes Móta, meu grande exemplo, por toda dedicação, amor, compreensão e apoio.

À minha irmã, Tâmara Éлита Móta Silva, e minha sobrinha Emily Gabriela Móta Barbosa por estarem sempre ao meu lado, rezando e me incentivando.

Ao meu esposo, Thiago Antonio Rodrigues Freire Lima pelo apoio, incentivo e carinho nesta jornada.

À toda minha família pelo estímulo e torcida em toda essa jornada.

À Professora Gílcia Aparecida de Carvalho e Professor Rafael Antonio do Nascimento Ramos pela amizade, orientação, conselhos, incentivo, compreensão e pelo tempo dedicado, foram primordiais para esta conquista. São inspiração para mim. Serei eternamente grata.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por todos os ensinamentos.

Aos que fazem ou fizeram parte da equipe do Laboratório de Parasitologia da UFAP, Guilherme, Ângela, Alexandre, Júlio, Jéssica, Carlos, Lúcia, Cícera, Lucas Santos, Lívia, Ivaldo, Rebeca, Eduardo Amorim, Talita, Eduardo Cordeiro, Iury, Arthur, Samuel, Lucas Azevedo e Renata, com cada um aprendi algo.

Aos funcionários da V Gerência Regional de Saúde, Gesika Silva, Karla Alves, Conceição Santana, Lourdes Rodrigues, Adeji do Carmo, Jeane Silva, Lílian Sampaio, Eliel, Bira e Severino (Biu) por todo o apoio, seja no laboratório, na coleta de dados ou em campo, gratidão pela experiência compartilhada.

A equipe do laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso Sul, especialmente o professor Carlos Alberto do Nascimento Ramos e Thaynádia Gomes Rios pelo auxílio nas análises moleculares.

Ao professor Kleber Régis Santoro e Edyniesky Ferrer-Miranda pela ajuda nas análises estatísticas.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e incentivaram a realizar este trabalho.

Resumo

Trypanosoma cruzi apresenta população heterogênea com sete linhagens reconhecidas denominadas de *Discrete Typing Units* (DTU's). O conhecimento dessas DTUs pode contribuir para melhor compreensão da epidemiologia da doença de Chagas e os possíveis fatores de risco de infecção ao homem. O objetivo deste estudo foi realizar levantamento entomológico de triatomíneos e caracterizar molecularmente as linhagens de *T. cruzi* que estão presentes nos vetores, em municípios do agreste de Pernambuco, Brasil. A partir de dados do Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas (PNCDch) foi realizado um estudo retrospectivo (2008-2017) para avaliar a ocorrência e distribuição de triatomíneos em 21 municípios. Além disso, durante o período de julho de 2018 a junho de 2019, triatomíneos foram coletados no intradomicílio e peridomicílio e identificados, para posterior extração de DNA. A pesquisa de *T. cruzi* foi realizada por meio de exames parasitológicos e moleculares. Para a pesquisa de DNA de *Trypanosoma* spp. foi realizada PCR, os produtos amplificados foram purificados e sequenciados. A genotipagem de *T. cruzi* foi realizada por Multiplex PCR. Para avaliar a distribuição espaço-temporal de triatomíneos infectados por tripanosomatídeos foram usados dados do PNCDch (2008-2018), incluindo o número total de triatomíneos capturados nas áreas intra e peridomiciliares, bem como a taxa de infecção (TI) por tripanosomatídeos. O método G_i^* por Getis–Ord foi usado para identificar agrupamentos de concentração estatisticamente significativos e a TI. O modelo de regressão linear generalizado com distribuição binomial foi usado para avaliar a probabilidade de detectar a taxa de infecção por tripanosomatídeos. Através do estudo retrospectivo, um total de 4694 triatomíneos foram coletados, sendo 94,5% no intradomicílio e 5,5% no peridomicílio. As espécies mais frequentes foram *Panstrongylus lutzi* (30,36%), *Triatoma brasiliensis* (26,12%), *Triatoma pseudomaculata* (22,43%) e *Panstrongylus megistus* (20,54%). Um total de 117 triatomíneos foram coletados, sendo 93,16% e 6,84% em ambientes intradomiciliar e peridomiciliar, respectivamente. As espécies capturadas foram *P. lutzi* (37,60%), *T. pseudomaculata* (26,50%), *T. brasiliensis* (23,08%) e *P. megistus* (12,82%). A taxa de infecção por *T. cruzi* foi de 5,49% e 12,09% em exames parasitológicos e moleculares, respectivamente. A análise molecular detectou 70,59% de genótipo TcI, em todas as espécies de triatomíneos identificadas e 29,41% de TcIII/TcIV em *P. megistus* e *P. lutzi*. A análise da distribuição espaço-temporal de

triatomíneos infectados por tripanosomatídeos foi realizada com 4.800 triatomíneos. Formas flagelares semelhantes a *T. cruzi* foram detectadas em 10,29% deles, e a maioria das amostras positivas (98,17%) foram coletadas no intradomicílio. As análises geoespaciais identificaram aglomerados de triatomíneos em ambientes intradomiciliares e peridomiciliares. A regressão logística para as espécies (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*) demonstrou que a probabilidade de detecção da infecção por *T. cruzi* permanece constante em até 50 espécimes examinados ou mais. A presença de triatomíneos infectados em áreas de intra e peridomicílio alerta para a implementação de ações de vigilância, como educação em saúde nas áreas de maior vulnerabilidade de ocorrência desses vetores. Além da adoção de medidas de controle entomológico sistemático para reduzir os riscos de infestação e, conseqüentemente, da doença de Chagas.

Palavras-chaves: Vetores, doença de Chagas, DTUs, tripanosomatídeos.

Abstract

Trypanosoma cruzi presents a heterogeneous population with seven lineages recognized, called Discrete Typing Units (DTU's). The knowledge of DTUs can contribute to a better understanding of the epidemiology of Chagas disease and the possible risk factors for infection to man. The study aimed to carry out an entomological survey of triatomines and molecularly characterize the lineages of *T. cruzi* present in vectors, in municipalities in the rural region of Pernambuco, Brazil. Based on data from the *Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas* (PNCDCh), a retrospective study (2008-2017) was conducted to assess the occurrence and distribution of triatomines in 21 municipalities. In addition, during the period from July 2018 to June 2019, triatomines were collected in intradomicile and peridomicile area and identified for subsequent DNA extraction. The search for *T. cruzi* was carried out through parasitological and molecular exams. For the DNA research of *Trypanosoma* spp. PCR was performed, and the amplified products were purified and sequenced. *T. cruzi* genotyping was performed by Multiplex PCR. To evaluate the spatiotemporal distribution of triatomines infected by trypanosomatid parasites, data from the PNCDch (2008-2018) were used, the total number of triatomines captured from intradomicile and peridomicile areas, as well as the infection rate (IR) by trypanosomatid. The G_i^* method by Getis–Ord method was used to statistically identify significant concentration clusters and the IR of triatomines by trypanosomatids. A generalized linear regression model with binomial distribution was used to evaluate the probability of finding an IR by trypanosomatids. A total of 4694 triatomines were collected, 94.5% and 5.5% from the intradomiciliary and peridomiciliary environments. The most frequent species were *Panstrongylus lutzi* (30.36%), *Triatoma brasiliensis* (26.12%), *Triatoma pseudomaculata* (22.43%) and *Panstrongylus megistus* (20.54%). A total of 117 triatomines were collected, 93.16% and 6.84% from the intradomiciliary and peridomiciliary environments, respectively. The captured species were *P. lutzi* (37.60%), *T. pseudomaculata* (26.50%), *T. brasiliensis* (23.08%), and *P. megistus* (12.82%). In parasitological and molecular tests, the *T. cruzi* infection rate was 5.49% and 12.09%. The molecular analysis detected 70.59% of the TcI genotype in all triatomine species identified and 29.41% of the TcIII/TcIV in *P. megistus* and *P. lutzi*. The analysis of the spatiotemporal distribution of triatomines infected by trypanosomatids was performed with 4,800 triatomines. The flagellar forms similar to

T. cruzi were detected in 10.29% of them, the majority of positive specimens (98.17%) were collected at intradomicile. The geospatial analyses identified triatomines clusters in intradomicile and peridomicile environments. The logistic regression for species (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. Brasiliensis*, and *T. pseudomaculata*) showed that the probability of detection of *T. cruzi* infection remains constant in up to 50 specimens examined or more. The presence of infected triatomines in intra and peridomicile areas calls for implementing surveillance actions, such as health education in areas where these vectors are most vulnerable. In addition, the adoption of systematic entomological control measures reduces the risks of infestation and, consequently, of Chagas disease

Keywords: Vectors, Chagas disease, DTUs, trypanosomatids.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 13 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 15 |
| 2.1 Triatomíneos..... | 15 |
| 2.1.1 Histórico e Taxonomia..... | 15 |
| 2.1.2 Morfologia..... | 16 |
| 2.1.3 Ciclo biológico..... | 20 |
| 2.1.4 Distribuição geográfica..... | 21 |
| 2.1.5 Habitat..... | 27 |
| 2.1.6 Fontes alimentares..... | 31 |
| 2.1.7 Controle da transmissão vetorial..... | 32 |
| 2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 33 |
| 2.2.1 Morfologia..... | 37 |
| 2.2.2 Ciclo biológico..... | 38 |
| 2.2.3 Hospedeiros..... | 39 |
| 2.3 Doença de Chagas..... | 41 |
| 3. Objetivos..... | 44 |
| 3.1 Geral..... | 44 |
| 3.2 Específicos..... | 44 |
| 4. Referências bibliográficas..... | 45 |
| CAPÍTULO 1 | |
| Distribuição espacial de triatomíneos em uma região endêmica para doença de Chagas no Brasil (<i>Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region from Brazil</i>)..... | 55 |
| CAPÍTULO 2 | |
| Caracterização molecular de DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> de espécies de triatomíneos em área endêmica para doença de Chagas (<i>Molecular characterization of Trypanosoma cruzi DTUs of the triatomine species in a Chagas disease endemic area</i>)..... | 67 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----|
| Infecções por tripanosomatídeos (Kinetoplastida:Trypanosomatidae) em triatomíneos (Hemiptera: Triatominae):Uma avaliação espaço-temporal em uma área endêmica para doença de Chagas (<i>Infections by trypanosomatid (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in triatomines (Hemiptera: Triatominae): a spatiotemporal assessment in an endemic area for Chagas Disease</i>)..... | 89 |
| 5. Considerações finais..... | 115 |
| Anexo 1 Artigo publicado no periódico, <i>Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i> , v. 52, 2019..... | 116 |
| Anexo 2 Artigo publicado no periódico, <i>Journal of Parasitic Diseases</i> , v. 46, 2021..... | 121 |
| Anexo 3 Artigo publicado no periódico, <i>Zoonoses and Public Health</i> , v. 69, 2021..... | 129 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Tribos, gêneros e número de espécies que compõem a subfamília Triatominae..... | 16 |
| Figura 1 – Vista dorsal de um exemplar de <i>Triatoma tibiamaculata</i> , adulto..... | 17 |
| Figura 2 – Exemplos macho e fêmea de <i>Triatoma juazeirensis</i> , detalhe para a porção dorso-apical do abdômen mostrando a diferença entre as genitálias..... | 17 |
| Figura 3 – Diferenciação dos gêneros <i>Panstrongylus</i> , <i>Rhodnius</i> e <i>Triatoma</i> | 18 |
| Figura 4 – Ovos de triatomíneos..... | 19 |
| Figura 5 – Ciclo de vida de <i>Triatoma brasiliensis</i> | 21 |
| Figura 6 – Distribuição geográfica de 10 espécies de triatomíneos registradas no estado de Pernambuco, Brasil, entre 2006 e 2007..... | 23 |
| Quadro 2 – Espécies de triatomíneos e sua distribuição geográfica no Brasil.... | 24 |
| Figura 7 – Áreas no intadomicílio que podem servir de abrigo para triatomíneos. | 30 |
| Figura 8 – Áreas no peridomicílio que podem servir de abrigo para triatomíneos. | 30 |
| Figura 9 – Distribuição espacial das DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos Biomas Brasileiros: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal..... | 35 |
| Figura 10– Formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em exame a fresco de fezes de triatomíneos, forma epimastigota (e) e tripomastigota metacíclica (t)..... | 38 |
| Figura 11 – Formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em mamíferos..... | 38 |
| Figura 12 – Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 39 |

1. Introdução

Triatomíneos (Hemiptera; Reduviidae) são insetos hematófagos, em todos os seus estágios de desenvolvimento, com grande importância para a saúde pública, pois são vetores de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC) (GALVÃO et al. 2014).

No Brasil, os triatomíneos possuem ampla distribuição geográfica, com maior diversidade de espécies registrada na região Nordeste, seguido das regiões Centro-Oeste, Norte, Sudeste e Sul (JURBERG et al., 2017). Geralmente, esses insetos ocupam ambientes silvestres (COMINETT et al., 2014), mas podem também ocupar áreas rurais adjacentes e centros urbanos (BARROS et al., 2021; PEREIRA et al., 2021). Ações antrópicas nos ambientes silvestres provocam o deslocamento e adaptação dos hemípteros aos ambientes artificiais próximos aos humanos (JUNQUEIRA et al., 2011; GALVÃO et al., 2014), aumentando o risco de contato e consequentemente, da transmissão por *T. cruzi*.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) é representado por uma população heterogênea (ZINGALES et al., 2012) e devido diferenças entre características genéticas, eco-epidemiológicas e patogenicidade são reconhecidas sete linhagens, denominadas de DTU's (*Discrete Typing Units*): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat (ZINGALES et al., 2012). No Brasil, todas as DTUs foram relatadas (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016) a partir de amostras de mamíferos silvestres, domésticos e vetores nos diferentes biomas (JANSEN et al., 2018). Porém, a diversidade genética de *T. cruzi* ainda é subestimada (JANSEN et al., 2020), apesar da caracterização dessas linhagens ser fundamental para a melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro (RIBEIRO et al., 2018) e da eco-epidemiologia da DC (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016).

Considerada um grave problema de saúde pública, a DC é endêmica em 21 países da América, com cerca de 14.000 mortes anuais no mundo (WHO, 2022). No Brasil, no período de 2010 a 2020 foram registrados 49.574 óbitos, destes, 11.210 ocorreram na região Nordeste, sendo 1.299 no estado de Pernambuco (BRASIL, 2022a). No país predominam os casos crônicos decorrentes de infecções vetoriais em décadas passadas (BRASIL, 2015), sendo assim, a vigilância entomológica deve ser implantada em todo o país, seja com a participação da população na notificação de triatomíneos, ou por vigilância ativa (BRASIL, 2021).

No Brasil, foram registrados dez gêneros e 66 espécies de triatomíneos, distribuídas nos seus diferentes biomas (JURBERG et al., 2017). Hemípteros em todos os biomas brasileiros ressalta que o país apresenta condições ambientais favoráveis a uma ou mais espécies, e conseqüentemente o risco para a transmissão de *T. cruzi* não pode ser desprezado em nenhum bioma (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

O estado de Pernambuco localiza-se em uma região considerada de risco de transmissão vetorial, concentrando ações na vigilância entomológica e controle vetorial (PERNAMBUCO, 2013). Há registros de triatomíneos em mais de 90% dos municípios pernambucanos (SILVA et al., 2012), principalmente no ambiente doméstico (SILVA et al., 2019) e com diferentes taxas de infecções por *T. cruzi* (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2017).

Porém, apesar desses dados, ainda são incipientes estudos entomológicos com triatomíneos e a frequência de infecção por *T. cruzi* no estado de Pernambuco. Essas informações são essenciais para identificar as áreas de vulnerabilidade para a presença de triatomíneos infectados, e, conseqüentemente de maior risco de DC. Sendo assim, podem ser adotadas medidas preventivas baseadas no controle entomológico, na educação em saúde com a população e contribuir para que as gerências de saúde possam implementar medidas de controle nas áreas de maior vulnerabilidade com maior eficiência, visando reduzir a incidência da DC.

2. Revisão de Literatura

2.1 Triatomíneos

2.1.1 Histórico e Taxonomia

O primeiro relato sobre o aspecto e hábitos de um triatomíneo foi realizado pelo padre Reginaldo de Lizárraga, no ano de 1590, durante uma viagem ao Peru e Chile. Charles Darwin durante sua viagem pela América do Sul observou esses insetos na Argentina, descrevendo que a hematofagia não causava dor e que em menos de 10 minutos de hematofagismo sua forma poderia mudar de plana para globular (GALVÃO; JURBERG, 2014; GALVÃO, 2017).

Porém, a primeira descrição formal de um triatomíneo foi realizada por De Geer, no ano de 1773, como *Cimex rubrofasciatus* (GALVÃO; JURBERG, 2014) e 60 anos depois, Laporte (1833) o designou como espécie do gênero *Triatoma* passando a ser chamado *Triatoma rubrofasciata* (GALVÃO, 2017).

No Brasil, em 1907, a pedido do sanitarista Oswaldo Cruz, o médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas viajou ao estado de Minas Gerais para atuar no controle de um surto de Malária. Chagas recebeu a informação da existência de um inseto hematófago conhecido como “barbeiro”, que no interior das habitações humanas, realizava o hematofagismo, geralmente no rosto das pessoas, após o apagar das luzes. No entanto, durante o dia o inseto permanecia escondido em locais como frestas das paredes e cobertura das casas, sendo difícil sua captura (CHAGAS, 1909). Tratava-se de um hemíptero *Conorhinus megistus*, conhecido atualmente como *Panstrongylus megistus* (Neiva, 1910) (JURBERG et al., 2005).

A classificação atual da subfamília Triatominae baseia-se, principalmente, na revisão de Lent e Wygodzinsky (1979). Está inserida no Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Subordem Heteroptera e Família Reduviidae (JURBERG et al., 2017). Atualmente são reconhecidas 157 espécies (154 existentes e três fósseis), e uma subespécies (COSTA et al., 2021) agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (Quadro 1) (ALEVI et al., 2021).

Quadro 1 - Tribos, gêneros e número de espécies que compõem a subfamília Triatominae. Fonte: Alevi et al., (2021).

| Tribo | Gênero | Espécies |
|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Alberproseniini | <i>Alberprosenia</i> | 2 |
| Bolboderini | <i>Belminus</i> | 9 |
| | <i>Bolbodera</i> | 1 |
| | <i>Microtriatoma</i> | 2 |
| | <i>Parabelminus</i> | 2 |
| Cavernicolini | <i>Cavernicola</i> | 2 |
| Rhodniini | <i>Psammolestes</i> | 3 |
| | <i>Rhodnius</i> | 21 |
| Triatomini | <i>Dipetalogaster</i> | 1 |
| | <i>Eratyrus</i> | 2 |
| | <i>Hermanlenticia</i> | 1 |
| | <i>Linshcosteus</i> | 6 |
| | <i>Mepraia</i> | 3 |
| | <i>Nesotriatoma</i> | 3 |
| | <i>Panstrongylus</i> | 15 |
| | <i>Paratriatoma</i> | 2 |
| | <i>Triatoma</i> | 81 |
| | <i>Paleotriatoma</i> | 1 |
| Total | | 157 |

2.1.2 Morfologia

As características morfológicas externas associadas ao padrão cromático das espécies são fundamentais para a descrição taxonômica de triatomíneos (GIRÓN et al., 1997).

Os triatomíneos possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, como os demais insetos (Figura 1). Através da muda ou ecdise, o exoesqueleto é trocado, permitindo o seu crescimento (ARGOLO et al., 2008). Na Figura 1, são apresentadas estruturas da morfologia externa de um triatomíneo.

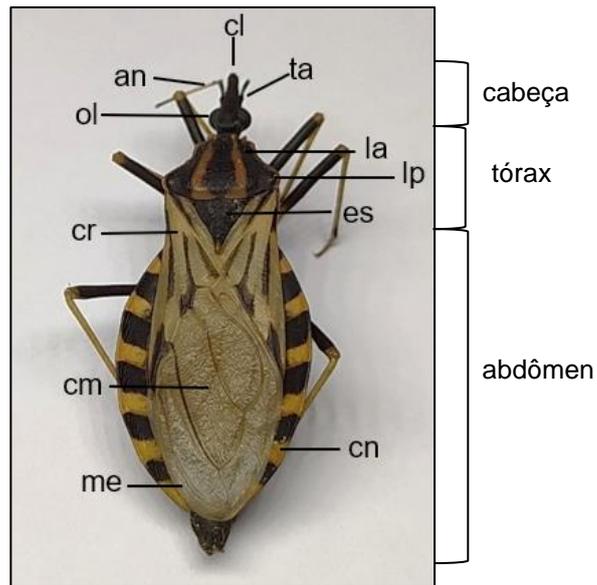


Figura 1 – Vista dorsal de um exemplar de *Triatoma tibiamaculata*, adulto. cl, clípeo; an, antena; ta, tubérculo antenífero; ol, olho; cr, cório; cm, célula da membrana; me, membrana; la, lobo anterior do pronoto; lp, lobo posterior do pronoto; es, escutelo; cn, conexivo. Fonte: Arquivo pessoal, (2021).

Nos triatomíneos adultos há a presença de ocelos, genitália e asas anteriores e posteriores bem desenvolvidas. Esses insetos apresentam dimorfismo sexual, pois as fêmeas são maiores que os machos da mesma espécie, possuem conexivo interrompido e o ápice do abdômen é pontudo pela presença do ovipositor. Nos machos, o conexivo é contínuo e o ápice abdominal é arredondado (Figura 2) (ARGOLO et al., 2008; GALVÃO; JURBERG, 2014).

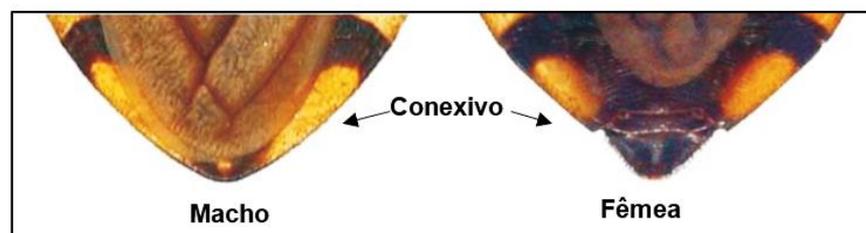


Figura 2 – Exemplares macho e fêmea de *Triatoma juazeirensis*, detalhe para a porção dorso-apical do abdômen mostrando a diferença entre as genitálias. Fotos: Rodrigo Méxas, IOC/Fiocruz. Fonte: Argolo et al. (2008), adaptado.

Os triatomíneos possuem a cabeça cilíndrica ou subcilíndrica, ovoide ou com forma mais ou menos cônica, curta ou alongada, variando conforme o táxon (GIRÓN et al., 1997). O rostro é formado pelo lábio dorsal ou labro e pelo lábio propriamente dito que forma a propóscide, tri-segmentada, curta e reta, que quando em repouso não ultrapassa o primeiro par de patas. Os olhos são compostos e constituídos por

omatídeos e posterior aos olhos situam-se os ocelos (GIRÓN et al., 1997). Pode-se observar um par de antenas formadas por quatro artigos e inseridas no tubérculo antenífero e com função sensorial. A posição do tubérculo antenífero é de grande importância para a identificação dos três principais gêneros de triatomíneos: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Espécies do gênero *Panstrongylus* possuem a cabeça curta e larga, de formato hexagonal e o tubérculo antenífero insere-se próximo da região anterior dos olhos. No gênero *Rhodnius*, a cabeça é cilíndrica e alongada e o tubérculo antenífero próximo à extremidade anterior da cabeça, enquanto no gênero *Triatoma*, a cabeça é cilíndrica com tubérculo antenífero no meio da região antecular (ARGOLO et al., 2008) (Figura 3).

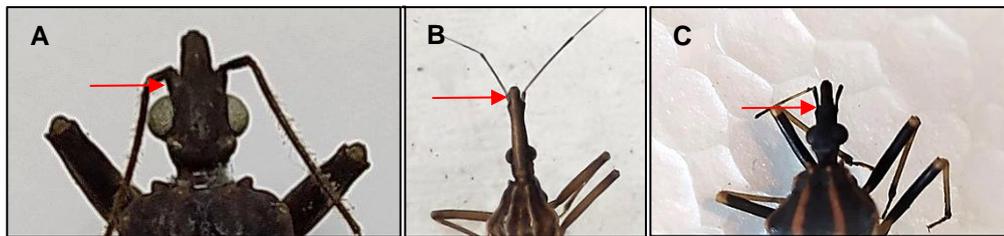


Figura 3 – Diferenciação dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. **A)** *Panstrongylus* **B)** *Rhodnius* **C)** *Triatoma*. A seta indica o tubérculo antenífero. Fonte: Arquivo pessoal, (2021).

O tórax é dividido em três segmentos: protórax (anterior), mesotórax (mediano) e metatórax (posterior). A região dorsal é chamada de noto, a lateral de pleura e a ventral de esterno. O primeiro segmento torácico dorsal apresenta forma trapezoidal e denomina-se pronoto. Este segmento é bem desenvolvido e dividido em lobo anterior e posterior e em algumas espécies observam-se estruturas de importância taxonômica como estruturas em forma de espinhos com ponta arredondada, denominadas de tubérculos distais e laterais (GIRÓN et al., 1997; JUNQUEIRA et al., 2011). O segundo segmento, em sua maioria, é coberto pelo pronoto e a única região visível é denominada de escutelo, que tem formato triangular. O terceiro segmento é pouco visível e reduzido (JUNQUEIRA et al., 2011).

No mesonoto se inserem as asas anteriores conhecidas como hemélitros (hemi=metade; elitro=asas) com regiões bem definidas: uma dura, resistente e coriácea na metade anterior basal, denominada de cório e a outra menos resistente, membranosa na porção distal (GIRÓN et al., 1997). A coloração dessas asas pode auxiliar na identificação de algumas espécies, enquanto o segundo par de asas é membranoso e não tem importância sistemática (JUNQUEIRA et al., 2011).

Em cada segmento torácico estão inseridos os apêndices locomotores, ou seja, três pares de patas, que podem apresentar anelações ou colorações que podem ser úteis na distinção de espécies (JUNQUEIRA et al., 2011; GALVÃO; JURBERG, 2014).

O abdômen é achatado dorso-ventralmente e constituído por 11 segmentos dorsais ou urotergitos e 11 ventrais ou uroesternitos. O 10º e o 11º segmentos constituem, respectivamente, o tubo anal e o ânus (GONÇALVES; COSTA, 2017). Para a conexão das faces dorsal e ventral, apresenta lateralmente, o conexivo, com manchas de importância para diferenciação de espécies (GIRÓN et al., 1997; JUNQUEIRA et al., 2011).

Quanto à morfologia, os ovos dos triatomíneos, apresentam forma que pode variar de cilíndrica (ex.: *Psammolestes arthuri*) a aproximadamente esférica (ex.: *Panstrongylus rufotuberculatus*) (BARATA, 1998). O ovo pode apresentar ornamentações diversas, inicialmente, apresenta coloração branca leitosa e com o desenvolvimento do embrião torna-se rosado até avermelhado indicando que o embrião está formado e o ovo próximo a eclodir (JUNQUEIRA et al., 2011) (Figura 4). As fêmeas do gênero *Rhodnius* põem os ovos aderidos ao substrato e as fêmeas dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* depositam os ovos livres, sem substância aderente. Estruturas presentes ou ausentes nos ovos como colo, chanfradura lateral e colarinho podem ser úteis na identificação de espécies (ROCHA; SANTOS, 2014).



Figura 4 – Ovos de triatomíneos, a: ovo recém liberado, b: ovo embrionado, c: ovo eclodido e opérculo. Fonte: Galvão et al. (2014).

A partir da eclosão da ninfa do ovo até à fase adulta, os triatomíneos passam por cinco estádios de ninfa, que podem se distinguir dos adultos por apresentarem olhos menores, ausência de ocelos, de asas e pela imaturidade sexual (GALVÃO; JURBERG, 2014). As ninfas inicialmente apresentam coloração rosada e no período

de uma hora, com o contato com o ar, a coloração torna-se marrom ou preta, dependendo da espécie, o que também é observado a cada ecdise (JUNQUEIRA et al., 2011).

2.1.3 Ciclo biológico

Os triatomíneos têm desenvolvimento hemimetábolo, apresentando uma fase de ovo, cinco estádios de ninfa e a fase adulta (Figura 5). Entre 20 e 30 dias após a cópula, a fêmea inicia a postura (de uma a duas centenas de ovos). A eclosão da ninfa ocorre quando o opérculo do ovo se desprende permitindo a saída da ninfa. Para que haja a mudança entre os estádios ninfais é necessário pelo menos um repasto sanguíneo, já que a distensão abdominal junto com outros fatores proteicos (hemoglobina) oriundos da alimentação sanguínea ativam células neurosecretoras. Estas células desencadeiam mensagens para a produção dos hormônios de muda (ecdisona) e do crescimento (hormônio juvenil). O período de desenvolvimento é variável, de acordo com a espécie, podendo ocorrer em três meses ou chegar a dois anos. Vale ressaltar, que a complementação do ciclo biológico é dependente de fatores abióticos, como temperatura (27 a 30° C) e umidade relativa (60 a 85%). Quando há alterações nessas condições, as ninfas podem morrer presas às exuvias, por não conseguir realizar a muda ou pode ainda ocorrer alterações morfológicas posterior à ecdise, diminuição da postura e da eclosão dos ovos (ARGOLO, 2008; JUNQUEIRA et al., 2011; GONÇALVES; COSTA, 2017).

A hematofagia ocorre em todos os estádios imaturos e na fase adulta, tanto por machos, quanto por fêmeas. Porém, pode ocorrer canibalismo, principalmente das ninfas mais jovens sobre as mais desenvolvidas (GONÇALVES; COSTA, 2017), coprofagia (fezes eliminadas por outros triatomíneos) e alimentação em hemolinfa de outros insetos, como *Dictyoptera* (LOROSA et al., 2000; JUNQUEIRA et al., 2011).

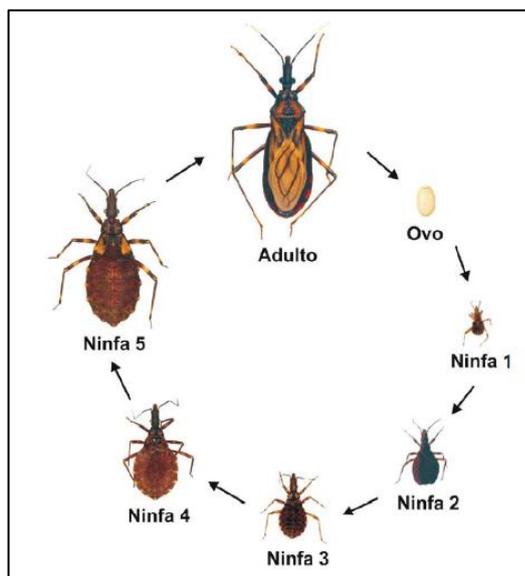


Figura 5 – Ciclo de vida de *Triatoma brasiliensis*. Fotos: Rodrigo Méxas, IOC/Fiocruz. Fonte: Argolo (2008), adaptado.

2.1.4 Distribuição geográfica

A maioria das espécies de triatomíneos ocorre apenas na região neotropical e algumas poucas são relatadas nos Estados Unidos, centro-sul da África, sudeste da Ásia e norte da Austrália (JURBERG et al., 2017).

Conforme dados revisados por Magalhães e colaboradores (2022), nos Estados Unidos foram registradas mais de dez espécies de triatomíneos, com maior diversidade nos estados do Texas, Novo México e Arizona. Espécies como *Triatoma sanguisuga* e *Triatoma gerstaeckeri* foram relatadas no Texas e em outros estados do sul dos EUA, ocasionalmente em domicílios, mas geralmente sem sinais de colonização. Na Venezuela, Colômbia e algumas áreas da América Central *Rhodnius prolixus* é o principal vetor e pode formar grandes colônias no interior dos domicílios humanos. Ainda, as espécies, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius pallescens* são envolvidas na ecoepidemiologia da DC em países da América Central (MAGALHÃES et al., 2022).

No Brasil, foram registrados dez gêneros e 66 espécies de triatomíneos, sendo a maioria na região Nordeste (30), seguido das regiões Centro-Oeste (29), Norte (28), Sudeste (19) e Sul (18). Destas espécies, cerca de dez, dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* têm maior importância epidemiológica, destacando-se *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius robustus* (JURBERG et al., 2017).

T. infestans por muitos anos foi considerado o vetor mais importante, devido a sua capacidade de domiciliação e adaptação a ambientes artificiais. Porém, devido às ações sistemáticas de controle vetorial, em 2006, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) concedeu ao Brasil a Certificação de Interrupção da Transmissão Vetorial da Doença de Chagas por *T. infestans*, (FERREIRA e SILVA, 2006). Atualmente, existem pequenos focos residuais deste vetor nos estados do Rio Grande do Sul e Bahia (JURBERG et al., 2017; BRASIL, 2021). Uma colônia com mais de 400 espécimes desta espécie foi detectada em um galinheiro no estado da Bahia (RIBEIRO-JÚNIOR et al., 2019).

T. brasiliensis é considerado o principal vetor de *T. cruzi* no Nordeste brasileiro, com registros nos estados de Pernambuco (SILVA et al., 2012), Piauí (COSTA et al., 2018), Sergipe (MELO et al., 2018), Paraíba (LILIOSO et al., 2017), Bahia (RIBEIRO-JÚNIOR et al., 2019), Ceará (CANDIDO et al., 2019; ALENCAR et al., 2021) e Rio Grande do Norte (BARBOSA-SILVA et al., 2019; LIMA-NEIVA et al., 2021; HONORATO et al., 2021). Esta espécie apresentou altas taxas de dispersão, infestação, colonização e infecção por *T. cruzi* em uma área da caatinga nordestina (BEZERRA et al., 2020).

T. pseudomaculata tem sua distribuição nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e no estado de Minas Gerais (JURBERG et al., 2017). No estado do Rio Grande do Norte foi a segunda espécie mais frequente, com ninfas e adultos capturados no intra e peridomicílio, sendo um indicativo de colonização desses ambientes por esta espécie (BARBOSA-SILVA et al., 2019). No estado da Bahia foi uma das espécies mais frequentes demonstrando sua capacidade sinantrópica.

P. megistus tem sua distribuição nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul, Sudeste e Norte nos estados do Pará e Tocantins (JURBERG et al., 2017). Esta espécie foi a mais frequente no Distrito Federal e junto com *Triatoma sordida* e *Rhodnius neglectus* são as espécies mais importantes na manutenção do risco de transmissão de *T. cruzi* a seres humanos no Brasil Central (MINUZZI-SOUZA et al., 2017).

R. robustus tem sua distribuição nas regiões Norte e nos estados do Maranhão e Mato Grosso (JURBERG et al., 2017). No estado do Pará foi a espécie mais frequente e com uma das maiores frequências de infecção por *T. cruzi* (84,7%) (BARROS et al., 2021).

No estado de Pernambuco ocorrem 12 espécies de triatomíneos, dos gêneros *Panstrongylus*, *Psammolestes*, *Triatoma* e *Rhodnius* (JURBERG et al., 2017). Silva e colaboradores (2012) relataram as espécies *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. lutzi* e *P. megistus* como as mais frequentes no estado (Figura 6). Essas espécies apresentam índices variáveis de infecções por *T. cruzi*, demonstrando sua importância na epidemiologia da doença de Chagas (PARENTE et al., 2017, CANDIDO et al., 2019,).

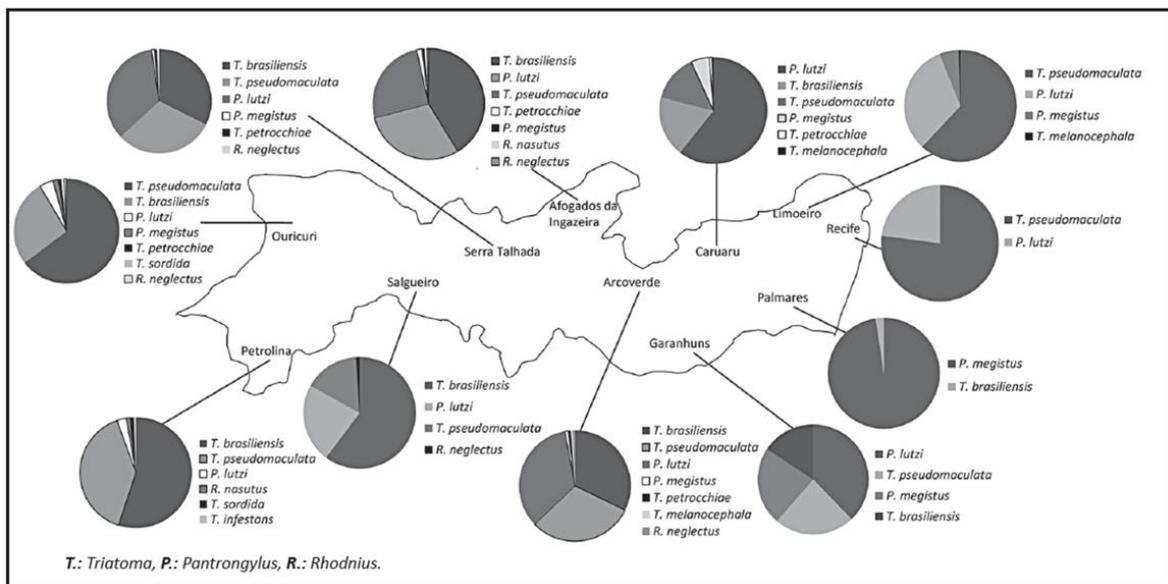


Figura 6 – Distribuição geográfica e abundância relativa de 10 espécies de triatomíneos registradas no estado de Pernambuco, Brasil, entre 2006 e 2007. Fonte: Silva et al., (2012).

No Quadro 2 estão sumarizadas as 66 espécies de triatomíneos registradas no Brasil (JURBERG et al., 2017).

Quadro 2– Espécies de triatomíneos e sua distribuição geográfica no Brasil. Fonte: Jurberg et al. (2017) (Continuação)

| ESPÉCIES | REGIÕES E UNIDADES FEDERATIVAS BRASILEIRAS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|----|----|----|----|----|----|----------|----|----|----|----|----|----|----|--------------|----|----|----|---------|----|----|----|-----|----|----|----|
| | NORTE | | | | | | | NORDESTE | | | | | | | | CENTRO-OESTE | | | | SUDESTE | | | | SUL | | | |
| | AC | AP | AM | PA | RO | RR | TO | AL | BA | CE | PB | PE | PI | MA | RN | SE | DF | GO | MS | MT | ES | MG | RJ | SP | PR | RS | SC |
| <i>T. tibiamaculata</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T. vandae</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T. vitticeps</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T. williami</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T. wygodzinskyi</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

AC – Acre; AP – Amapá; AM – Amazonas; PA – Pará; RO – Rondônia; RR – Roraima; TO – Tocantins; AL – Alagoas; BA – Bahia; CE – Ceará; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; PI – Piauí; MA – Maranhão; RN – Rio Grande do Norte; SE – Sergipe; DF – Distrito Federal; GO – Goiás; MS – Mato Grosso do Sul; MT – Mato Grosso; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; PR – Paraná; RS – Rio Grande do Sul, SC – Santa Catarina.

2.1.5 Habitat

Os triatomíneos podem ser encontrados em diferentes ecótopos. As colônias podem estar associadas a ecótopos estáveis ou instáveis, conforme as características do esconderijo do vetor (DIOTAIUTI, 2017). Nos primeiros, há a permanente presença de fontes alimentares e o microclima sofre menores variações em comparação ao ambiente externo, resultando em colônias com densidades maiores. Pode-se citar como exemplo, algumas espécies de palmeiras colonizadas, principalmente, por *Rhodnius* spp.. Essas palmeiras são frequentadas por aves, roedores, morcegos, marsupiais e anfíbios que servem de fontes alimentares para os insetos. Nos ecótopos instáveis, a disponibilidade de alimento é esporádica, há variações de temperatura e umidade similar ao ambiente externo. Como exemplo, cascas de árvores secas, em que as fontes alimentares são mais restritas, apresentando colônias com número reduzido de insetos (DIOTAIUTI, 2017).

Para os triatomíneos, um abrigo adequado deve ser estreito, escuro, com constante microclima, independente de oscilações externas e que contenha sinais químicos que possam atrair e mantê-los agregados (LAZZARI, 2014).

Geralmente, os vetores ocupam ambientes silvestres (COMINETTI et al., 2014) e podem habitar fendas de rochas, tocas de animais no solo, ninhos de aves, palmeiras, ocos de árvores, cavernas e bromélias (ARGOLO, 2008; JURBERG et al., 2017). No entanto, ações antrópicas no ambiente natural resultam na fuga da fauna local, e conseqüentemente ocasiona o deslocamento dos triatomíneos silvestres para moradias humanas e o seu entorno peridomiciliar (JUNQUEIRA et al., 2011; GALVÃO et al., 2014). Mudanças no cenário epidemiológico da DC na Amazônia brasileira foi observado no comportamento de *R. pictipes*, que apesar de ser considerado silvestre foi capturado em área urbana, reforçando a necessidade de novas medidas de vigilância e controle (PEREIRA et al., 2021)

Espécies de triatomíneos são capazes de invadir ativamente áreas residenciais humanas atraídos por fontes de luz (CARBAJAL DE LA FUENTE et al., 2007) em busca de abrigo ou de fontes alimentares (SILVA et al., 2017). Ainda pode ocorrer a invasão passiva, como pelo transporte de madeira infestada do ambiente silvestre acumulando-se no peridomicílio, servindo de abrigo associado com animais sinantrópicos potenciais reservatórios de *T. cruzi*, como marsupiais e roedores (FREITAS et al., 2004).

A presença de triatomíneos é relatada em ambientes urbanos (PARENTE et al., 2017; RIBEIRO et al., 2016, PEREIRA et al., 2021) e rurais (FIDALGO et al., 2018; SARQUIS et al., 2012, BARROS et al., 2021), tanto no intra como no peridomicílio. Na área urbana de Diamantina, Minas Gerais, 87,9% dos triatomíneos foram capturados no intradomicílio e todas as residências eram feitas de tijolos, telhados com laje e/ou telhas de cerâmica ou amianto (DIAS et al., 2016a). Colônias intradomiciliares caracterizadas pela presença de todos os instares de desenvolvimento do inseto, incluindo ovos foram relatadas em abundância sob colchões e no interior de paredes de barro rachadas ou superfícies de paredes rebocadas (DOS SANTOS et al., 2017). No agreste pernambucano, triatomíneos foram capturados em residências de alvenaria, cobertas com teto de telha demonstrando a adaptação desses vetores. Este fato reforça a necessidade da elaboração de políticas educativas e do monitoramento constante das áreas afetadas, a fim de interromper o ciclo de transmissão de *T. cruzi* (FARIAS et al., 2019).

Em áreas rurais, ecótopos artificiais como galinheiros, pocilgas, currais, poleiros, cercas e pilhas de madeira, pilhas de tijolos e telhas podem ser usados como abrigo e fonte de alimento por estarem associados a espécies de mamíferos (SARQUIS et al., 2006; SARQUIS et al., 2012; DIOTAIUTI, 2017).

No nordeste brasileiro *R. nasutus* habita, geralmente, palmeiras *Copernicia prunifera* (carnaúba), mas também foi capturado no intradomicílio demonstrando o ecletismo ecológico dessa espécie, que pode estar readaptando seu habitat natural devido a ações antrópicas (SARQUIS et al., 2012). Nessa mesma região, cactáceas como *Cereus jamacaru* (mandacaru) podem abrigar ninhos de aves, que podem servir de abrigo e fonte alimentar para *R. neglectus* e *T. pseudomaculata* (CARBAJAL DE LA FUENTE et al., 2008). Nessa região, *T. brasiliensis* foi capturado no ambiente silvestre, em rochas com presença de vegetação xerófila, que podem servir para ninhos de aves, ou ainda as fissuras e rachaduras dessas rochas servir de esconderijo para animais potenciais fontes alimentares (SARQUIS et al., 2010). Em uma área do semiárido, espécimes de *T. brasiliensis* foram capturados em habitats peridomiciliar (57,5%), silvestre (35,8%) e intradomiciliar (6,7%). As telhas, tijolos, pedras e madeira serviram de ecótopos estáveis, proporcionando um aumento da infestação, abrigo e disponibilidade de fontes alimentares. A dispersão ativa e passiva desses insetos entre ecótopos é favorecida quando essas estruturas são construídas ou modificadas entre as intervenções químicas (BEZERRA et al., 2020). A prevalência

de *T. brasiliensis* infectados em ambientes peridomiciliares (ex.: pilhas de madeira/telha/tijolo) foi maior do que no ambiente silvestre. Sendo assim, programas educacionais podem ser usados para informar aos moradores sobre os riscos associados à criação de ecótopos artificiais no ambiente peridomiciliar (MONSALVE-LARA et al., 2021).

No estado do Rio Grande do Norte, *Triatoma brasiliensis brasiliensis* foi capturado em ambientes domésticos, peridomésticos e silvestres, ocupando diferentes ecótopos (alpendres, afloramentos rochosos, paredes de pedra e concreto, galinheiros, currais de gado). Dentre os habitats pesquisados, as paredes de pedra dos currais de gado se destacaram como os mais infestados, possivelmente por ser uma estrutura peridoméstica permanente e muitas vezes servir de ligação com o ambiente silvestre, favorecendo o fluxo de triatomíneos e roedores silvestres entre os ecótopos (LIMA-NEIVA et al., 2021).

Árvores típicas do sertão nordestino como catingueira, umbuzeiro, imburana, baraúna, quixabeira, jurema preta, angico, aroeira podem ser infestadas por triatomíneos, como *T. pseudomaculata* (CARBAJAL DE LA FUENTE et al., 2008).

Espécies de importância epidemiológica no estado de Pernambuco como *P. lutzi* tem como principais habitats silvestres, tocas de tatus, rochas habitadas por roedores, galinheiros (peridomicílio), além de domicílios (JURBERG et al., 2014). Exemplos de *P. megistus* embora possam ser encontrados em copas de palmeiras, estão predominantemente associados a tocas terrestres e ocos de árvores, além de serem encontrados no peri e intradomicílio (GAUNT; MILES, 2000). *T. brasiliensis* é considerado o vetor mais importante de *T. cruzi* no nordeste brasileiro. No ambiente silvestre é encontrado em ocos de árvores, ou sob rochas e cercas de pedras, que servem de abrigo para roedores (BARBOSA-SILVA et al., 2016; COSTA et al., 1998), ou infestando *Pilosocereus gounellei* (xiquexique), espécie de cacto comum na Caatinga (VALENÇA-BARBOSA et al., 2015). *T. pseudomaculata* no ambiente silvestre tem como habitat cascas de árvores, refúgios de roedores e marsupiais, no peridomicílio, currais e galinheiros, além dos domicílios (JURBERG et al., 2014).

Na figura 7, áreas no intradomicílio e no peridomicílio (Figura 8) que podem servir de abrigo para triatomíneos no agreste pernambucano.

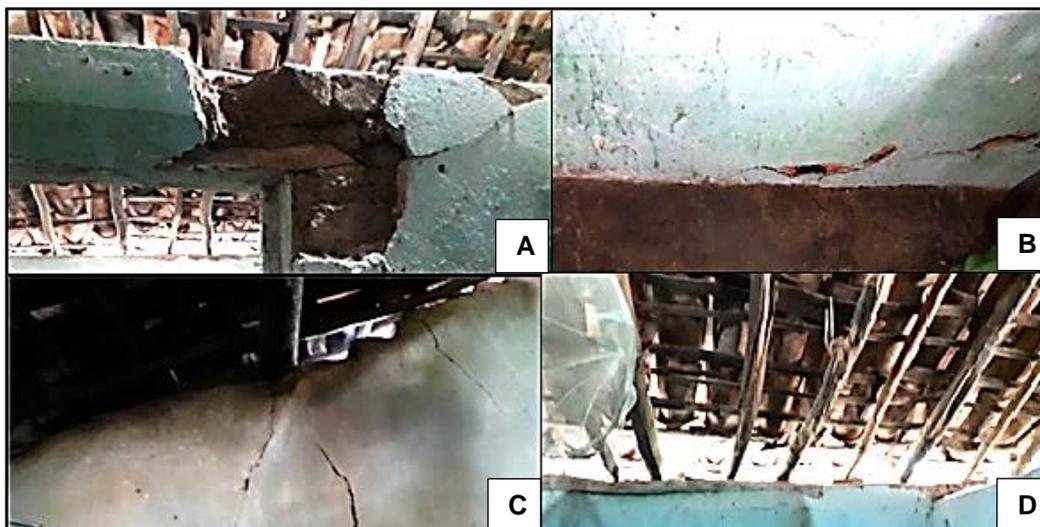


Figura 7 – Áreas no intadomicílio que podem servir de abrigo para triatomíneos, fendas nas paredes (A, B), espaços entre as telhas (C, D). Fonte: Arquivo pessoal, (2019).



Figura 8 – Áreas no peridomicílio que podem servir de abrigo para triatomíneos, pilhas de tijolos e madeiras (A), cercas de madeira (B), galinheiros (D), abrigo de animais domésticos (D) Fonte: Arquivo pessoal, (2019).

A capacidade de adaptação dos triatomíneos a ambientes artificiais, como o intra e peridomicílio é variável de acordo com a espécie. As que melhor se adaptam ao ambiente intradomiciliar são consideradas espécies de importância primária na transmissão domiciliar de *T. cruzi* e as demais, são espécies consideradas secundárias (DIOTAIUTI, 2017).

Contudo, os triatomíneos podem ser capturados em diferentes ecótopos naturais e artificiais, originados por ação antrópica e esses podem estar justapostos, o que aumenta a interação entre vetores e seres humanos, desafiando a vigilância e o controle vetorial (SARQUIS et al., 2012).

2.1.6 Fontes alimentares

De acordo com o ecótopo em que estão inseridos, os hemípteros hematófagos podem estar associados a diferentes fontes alimentares, preferencialmente animais homeotérmicos como aves e mamíferos, mas também podem se alimentar de animais pecilotérmicos como anfíbios e répteis (DIOTAIUTI, 2017).

Receptores sensoriais localizados nas antenas e rostro dos triatomíneos percebem estímulos oriundos dos hospedeiros como calor, produtos químicos eliminados pela pele ou respiração ou associados aos seus habitats (LAZZARI., 2014).

Há relatos de aproximadamente cinco classes taxonômicas que servem como fonte de alimentação para triatomíneos: Mammalia, Aves, Amphibia, Reptilia e Insecta. Dentre os mamíferos, espécies pertencentes as famílias: Hominidae (humanos e não humanos), Felidae, Canidae, Leporidae, Bovidae, Dasypodidae, Didelphidae, Equidae, Suidae, Myrmecophagidae, Bradypodidae e Mephitidae e as ordens Chiroptera e Rodentia (RABINOVICH et al., 2011).

O ecletismo alimentar é relatado em todos os estágios de desenvolvimento deste artrópode. Em condições de laboratório, ninfas de primeiro ínstar de *Triatoma* spp. tiveram preferência alimentar bem definida para sangue de ave, roedor, cão e gambá (LOROSA et al., 2008). Ninfas de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, colonizando o peridomicílio, foram observadas com mais frequência associadas à presença de galináceos onde desenvolveram colônias densas, facilitando a invasão intradomiciliar (BARBOSA-SILVA et al., 2016). DNA humano foi detectado em ninfa de quinto ínstar de *T. brasiliensis* capturada no intradomicílio, sendo um alerta, pois é indicativo de colonização intradomiciliar (VALENÇA-BARBOSA et al., 2015). Já adultos de *P. lutzii* tiveram como fonte alimentar sangue de ave, roedor, gambá, boi, cavalo, gato, tatu e humano, e ainda alimentações mistas como sangue de roedor/ave, boi/roedor, tatu/roedor, humano/ave, gambá/tatu, gambá/boi, gato/roedor, cavalo/ave, gambá/ave/boi o que sugere que o espécime pode circular entre os ambientes silvestre e peridomiciliar (CARANHA et al., 2006).

No estado do Rio Grande do Norte, o sangue de bovinos foi relatado como uma importante fonte alimentar para espécimes de *T. b. brasiliensis*, que mantiveram numerosas colônias em currais nas proximidades das moradias humanas. Na mesma área, sangue de *Kerodon rupestris* foi detectado como fonte alimentar, esses espécimes formaram colônia em afloramentos rochosos próximos (20-50m) do curral do gado. Além disso, sangue de *Mus musculus* e *Capra hircus* foram observados em *T. b. brasiliensis* capturados no peridomicílio (currais de gado). Vetores alimentados com sangue de *K. rupestris*, *M. musculus* e *Galea spixii* capturados em currais sugere interação entre ecótopos silvestres e peridomésticos. (LIMA-NEIVA et al., 2021). Neste mesmo estado, *T. brasiliensis* teve como fonte alimentar mais frequente, sangue de roedores (*G. spixii*, *K. rupestris*, *Rattus rattus*, *Thrichomys apereioide* e *Mus musculus* em ambientes peridomiciliares e silvestres (*M. musculus*). Além de alimentações com sangue humano (*Homo sapiens*), de cães (*Canis lupus familiaris*) e bovinos (*Bos taurus*). A espécie *T. pseudomaculata* foi encontrada alimentando-se de sangue em *Canis lupus familiaris* e *P. lutzi* de sangue de *M. musculus* (HONORATO et al., 2021).

No estado de Pernambuco *T. brasiliensis* apresentou o maior número de fontes alimentares, seguido por *P. lutzi* e *T. pseudomaculata* e 12,2% desses vetores alimentaram-se com sangue humano, sendo também identificadas como fontes alimentares sangue de aves (28%), roedores (22%), cães (10,7%), cabras (9,2%), gambás (9%), gatos (3,3%), baratas (2,9%), equinos (1,2%), lagartos (1,1%), bovinos (0,9%), rãs (0,9%), suínos (0,7%), tatus (0,7%) e quatis (0,2%). Foi demonstrado o ecletismo alimentar e sugerido que a degradação ambiental pode aproximar animais como marsupiais e roedores das residências, onde seus esconderijos podem servir de abrigo para os triatomíneos. Adicionalmente, a criação de animais de produção nas áreas peridomiciliares pode contribuir para a dispersão desses vetores (SILVA et al., 2017).

2.1.7 Controle da transmissão vetorial

O controle químico é a medida de controle vetorial recomendada para ações de proteção coletiva. Sendo assim, no Brasil, para o controle de triatomíneos recomenda-se a aplicação de inseticidas piretróides, devido ao seu poder residual, além da suscetibilidade dos vetores a esses inseticidas, neste caso, o princípio ativo

preconizado é a alfacipermetrina ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$) com dose de $40mg/m^2$ (BRASIL, 2020).

A indicação de borrifação residual é realizada de acordo com a espécie do vetor. Caso sejam encontrados espécimes de *T. infestans* a unidade domiciliar (UD) positiva deve ser borrifada e 100% das UDs da localidade devem ser pesquisadas e se necessário borrifadas. Além disso, localidades com presença de *T. infestans* devem permanecer sob vigilância, sendo monitoradas anualmente por um período mínimo de 3 anos. A área é considerada livre do vetor quando o resultado da pesquisa for negativo, durante o período de 3 anos consecutivos. Caso sejam encontradas espécies capazes de gerar colônias domiciliares (*P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. rubrovaria*, *T. sordida*) a borrifação deve ser realizada na UD positiva e a pesquisa ampliada para um raio mínimo de 100 metros. Caso sejam encontrados exemplares adultos de espécies predominantemente silvestres (*T. tibiamaculata*, *T. vitticeps*, *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *R. domesticus*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. robustus*), a borrifação não deve ser realizada (BRASIL, 2020).

Contudo, apesar da pulverização com inseticidas piretróides reduzir fortemente a infestação, no caso de *T. brasiliensis*, principal vetor no nordeste brasileiro, um estudo realizado em uma área da caatinga nordestina, o número de triatomíneos voltou aos níveis pré-intervenção em média 14 meses após a primeira pulverização. Com isto, a capacidade vetorial de *T. brasiliensis* somada ao seu potencial invasor e a eficácia limitada do controle químico na caatinga, representam importantes obstáculos à eliminação do risco de transmissão doméstica. Sendo necessárias estratégias sistemáticas de controle dessa espécie (BEZERRA et al., 2020).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Trypanosoma* (REY, 2008).

Este protozoário foi descoberto pelo médico Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas em 1909, na cidade de Lassance, Minas Gerais, ao observar formas flageladas durante o exame do intestino de um inseto conhecido por barbeiro e que realizava hematofagia em humanos, durante a noite. Inicialmente, havia a hipótese que se tratava de *Trypanosoma minasense*, que infectava saguis. Espécimes de barbeiros foram enviadas para o Doutor Oswaldo Cruz, que verificou se tratar de tripanosomas

distintos dos encontrados em primatas. Sendo assim, o Dr. Carlos Chagas denominou o novo flagelado de *Schizotrypanum cruzi*, em homenagem ao Dr. Oswaldo Cruz, que posteriormente passou a ser chamado de *Trypanosoma cruzi* (KROPF, 2009).

T. cruzi é representado por um conjunto de populações, conhecidas como isolados ou linhagens, essas populações apresentam heterogeneidade biológica, como graus variados de virulência para animais experimentais e humanos, diferentes sensibilidades a drogas e tropismo tissular. Essa diversidade é explicada por *T. cruzi* ser um agente diploide que se multiplica por divisão binária, e sendo assim, o genoma de cada isolado evolui de forma independente. A partir do final da década de 70 foram realizados os primeiros estudos de genética de populações de *T. cruzi*. Michael Miles relatou, a partir da análise do polimorfismo dos perfis eletroforéticos enzimáticos, que os isolados foram divididos em três grupos principais denominados de zimodemas. Os zimodemas Z1 e Z3 tinham o predomínio de linhagens do ciclo silvestres (gambás e triatomíneos) e o zimodema Z2, agrupava linhagens do ciclo doméstico (humanos e mamíferos domésticos) (ZINGALES, 2017).

Atualmente as linhagens de *T. cruzi* são denominadas de *Discrete Typing Units* - DTU (Unidades Discretas de Tipagem): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat (ZINGALES et al., 2009, ZINGALES et al., 2012). DTU é conceitua como um conjunto de populações geneticamente semelhantes que podem ser identificadas por marcadores genéticos, imunológicos e moleculares em comum (JANSEN et al., 2017).

No Brasil, todas as DTUs de *T. cruzi* foram relatadas (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016) a partir de amostras de mamíferos silvestres, domésticos e vetores nos diferentes biomas (Figura 9), no entanto, ainda são incipientes dados sobre sua distribuição na natureza, hospedeiros, reservatórios e seu potencial de risco para a doença de Chagas (JANSEN et al., 2017).

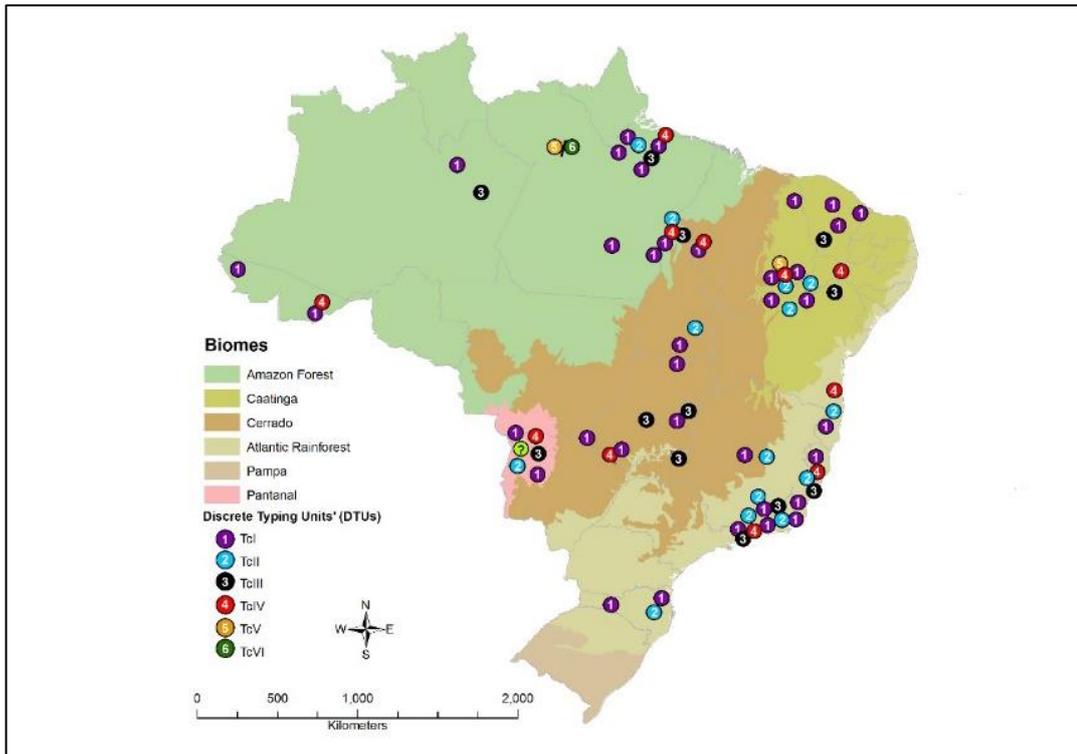


Figura 9– Distribuição espacial das DTUs de *Trypanosoma cruzi* nos Biomas Brasileiros: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal. Fonte: Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos - IOC/FIOCRUZ - <http://chagas.fiocruz.br/biogeografia/>

TcI é a principal DTU identificada em vetores (BRENIÈRE et al., 2016) e com a maior dispersão nas Américas. Este genótipo está associado a ecótopos primários (arbóreos, ocos de árvores) e secundários (terrestres na Amazônia). Tem como hospedeiros silvestres espécies das ordens Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Pilosa, Primates, Rodentia, Xernathra (MAGALHÃES et al., 2022). Além de animais silvestres, foi isolado em *Canis familiaris* no estado do Ceará (BEZERRA et al., 2014). No Brasil, esta DTU foi isolada em espécies de triatomíneos como *P. megistus* (RIBEIRO et al., 2016), *T. petrockinae* (LIMA-OLIVEIRA et al., 2020), *T. brasiliensis* (BEZERRA et al., 2018; LILIOSO et al., 2017; LIMA-OLIVEIRA et al., 2020), *T. vitticeps* (DARIO et al., 2018) e *T. sordida* (COMINETTI et al., 2014). No nordeste brasileiro, esta DTU foi isolada de *T. brasiliensis* capturados no intradomicílio e em pilhas de telhas, pocilgas e currais (BEZERRA et al., 2018; VALENÇA-BARBOSA et al., 2021), *T. pseudomaculata* capturados no peridomicílio (BRITO et al., 2008; HONORATO et al., 2021), *R. nasutus* (BRITO et al., 2008), *T. juazeirensis* e *T. melanica* capturados no ambiente silvestre (WANIEK et al., 2020). Em infecções mistas com TcII em *T. sherlocki* capturados no intra e peridomicílio (WANIEK et al., 2020) e *T. brasiliensis* capturados no peridomicílio

(HONORATO et al., 2021). As infecções humanas por esta DTU se concentram no norte da América do Sul e Central e estão associadas à cardiomiopatia chagásica (ZINGALES et al., 2012). Em humanos, no Brasil, foi isolada no estado do Paraná (ABOLIS et al., 2011).

TcII é a segunda DTU mais isolada no Brasil, está associada ao ciclo de transmissão doméstico nas regiões centrais e sul da América do Sul. Com relatos em hospedeiros das ordens Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Primates, Rodentia (MAGALHÃES et al., 2022). Em triatomíneos, no Brasil, foi descrita em *T. brasiliensis* em ambiente intra e peridomiciliar (pilha de tijolos e galinheiros), além do ambiente silvestre (BEZERRA et al., 2018; VALENÇA-BARBOSA et al., 2021), *T. vitticeps*, *P. geniculatus* (DARIO et al., 2018), *T. sordida*, *T. matogrossensis* e *P. megistus* (COMINETTI et al., 2014). No Nordeste foi isolado de *T. brasiliensis* capturados no peridomicílio e ambiente silvestre (BARBOSA-SILVA et al., 2016). Em humanos é associada com cardiomiopatia e mega síndromes no Atlântico e no Brasil Central (ZINGALES et al., 2012) e foi a DTU com maior frequência em isolados de humanos no Paraná (ABOLIS et al., 2011). No Brasil foi a principal DTU identificada em pacientes com doença de Chagas crônica (92,9%) com formas cardíaca, indeterminada ou cardiodigestiva, nascidos nas regiões Sudeste e Nordeste (NIELEBOCK et al., 2020).

O genótipo TcIII tem distribuição na América do Norte e Sul, associado principalmente ao ciclo silvestre e a hospedeiros das ordens Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Primatas, Rodentia (MAGALHÃES et al., 2022). Foi isolado em triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma* (DARIO et al., 2018) e *Rhodnius* (JANSEN et al., 2017). No nordeste brasileiro foi isolado em *P. lutzii* no ambiente silvestre e doméstico (CÂMARA et al., 2010; HONORATO et al., 2021) e *T. brasiliensis* (CÂMARA et al., 2010; VALENÇA-BARBOSA et al., 2021). É raro em humanos (MAGALHÃES et al., 2022) com isso, a apresentação clínica da doença de Chagas é pouco conhecida (ZINGALES et al., 2012).

O genótipo TcIV possui distribuição nas Américas, associado principalmente ao ciclo domésticos e tem como hospedeiros espécies das ordens Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Primates (MAGALHÃES et al., 2022). No Brasil foi descrito em *Triatoma vitticeps* (DARIO et al., 2018) e em um cão doméstico em Manaus, Amazonas (VASCONCELOS et al., 2020).

TcV tem distribuição na América do Norte e América do Sul, associado ao ciclo doméstico, com hospedeiros das ordens Cingulata, Didelphimorphia e Rodentia. Em humanos provoca doença de Chagas nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva (MAGALHÃES et al., 2022).

O genótipo TcVI tem distribuição na América do Sul, em ciclos domésticos e hospedeiros das ordens Didelphimorphia e Rodentia. Em humanos provoca as mesmas manifestações clínicas do genótipo TcV. No Brasil foi isolado em *T. brasiliensis* (LIMA-OLIVEIRA et al., 2020) e em pacientes chagásicos crônicos (NIELEBOCK et al., 2020).

TcBat tem distribuição na América Central e América do Sul, no ciclo silvestre, associado a espécies da Ordem Chiroptera (MAGALHÃES et al., 2022). No Brasil, foi isolado de quirópteros, *Myotis* spp. e *Noctilio* sp. oriundos das regiões Centro-Oeste e Sudeste (MARCILI et al., 2009), na Colômbia em uma criança (RAMIREZ et al., 2014) e no Brasil foi isolado pela primeira vez em triatomíneo da espécie *Triatoma sordida*, no estado do Mato Grosso (COMINETTI et al., 2014).

Contudo, a diversidade de *T. cruzi* é provavelmente subestimada (JANSEN et al., 2020), sendo que a caracterização dos diferentes genótipos é de grande importância para entender a eco-epidemiologia da infecção (BRENIERE et al., 2016). É importante salientar que a genotipagem de amostras de pacientes de DC pode auxiliar a esclarecer aspectos da patologia e diagnóstico clínico (WANIEK et al., 2020), além de auxiliar no entendimento da interação parasito-hospedeiro (RIBEIRO et al., 2018), porém as associações de genótipos de *T. cruzi* e espécies hospedeiras ou variáveis ambientais devem ser propostas com cautela (JANSEN et al., 2020).

2.2.1 Morfologia

T. cruzi apresenta um corpo robusto, com cerca de 16 a 20 µm de comprimento. Possui extremidade posterior pontiaguda, uma membrana ondulante e flagelo livre. O cinetoplasto é grande e subterminal, o que faz com que o corpo se torne proeminente ao redor dele (TAYLOR, 2017).

As principais formas de *T. cruzi* observadas nos vetores são epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, já nos hospedeiros mamíferos as formas amastigotas, que são intracelulares e tripomastigotas sanguíneas (REY, 2008; TAYLOR, 2017).

No intestino do vetor a forma epimastigota (Figura 9) apresenta cinetoplasto discoide, anterior ao núcleo, que é bem evidente, membrana ondulante rudimentar e

flagelo livre (REY, 2008). Esta é a forma de multiplicação, que ocorre por divisão binária (JUNQUEIRA et al., 2011). As formas tripomastigotas metacíclicas (Figura 10) apresentam cinetoplasto bem desenvolvido, situado na extremidade, posterior ao núcleo, com núcleo e membrana ondulante bem desenvolvidos e com flagelo livre (REY, 2008).

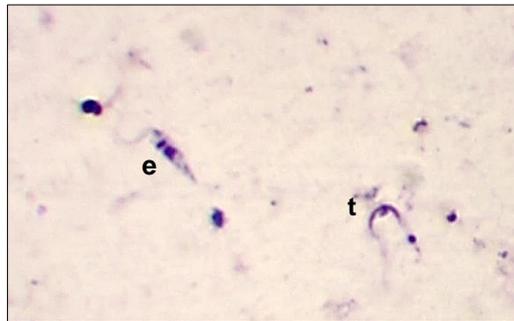


Figura 10 – Formas de *Trypanosoma cruzi* em exame a fresco de fezes de triatomíneos, forma epimastigota (e) e tripomastigota metacíclica (t). Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Nos hospedeiros mamíferos as tripomastigotas sanguíneas são semelhantes às tripomastigotas metacíclicas (Figura 11A). Nesses hospedeiros, a forma amastigota apresenta multiplicação intracelular (JUNQUEIRA et al., 2011) com aspecto arredondado ou ovoide com cinetoplasto discoide, anterior a um núcleo bem desenvolvido, com flagelo rudimentar no interior de uma bolsa flagelar (REY, 2008) (Figura 11B).

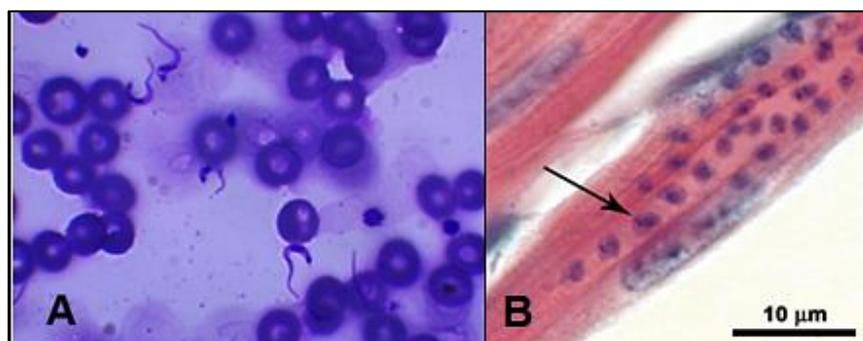


Figura 11 – Formas de *Trypanosoma cruzi* em mamíferos. A) Tripomastigota sanguínea em esfregaço de sangue humano. Fonte: Arquivo pessoal, (2019). B) Amastigota (seta) no músculo cardíaco de camundongo infectado com *T. cruzi*. Fonte: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>

2.2.2 Ciclo biológico

O triatomíneo durante o hematofagismo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas. No intestino anterior, diferenciam-se em epimastigotas e migram para o intestino médio, onde multiplicam-

se por divisão binária. No intestino posterior, as epimastigotas se aderem ao epitélio intestinal, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas (processo conhecido por metaciclogênese). Essas formas são infectantes para o hospedeiro vertebrado e são eliminadas junto com as fezes do vetor (AZAMBUJA, 2017; JUNQUEIRA et al., 2011). Como os triatomíneos têm o frequente hábito de defecar durante ou logo em seguida ao repasto sanguíneo, as formas infectantes, via mucosa ou solução de continuidade na pele do vertebrado, penetram no hospedeiro. As tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares, como células musculares estriadas e lisa, macrófagos, células epiteliais e fibroblastos. As formas metacíclicas formam um vacúolo parasitário, onde se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Com o aumento das formas amastigotas no interior das células, estas se rompem e ocorre a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas sanguíneas, que passam à corrente sanguínea, podendo invadir novas células ou serem ingeridas por novos vetores durante o repasto sanguíneo (JUNQUEIRA et al., 2011; TAYLOR, 2017) (Figura 12).

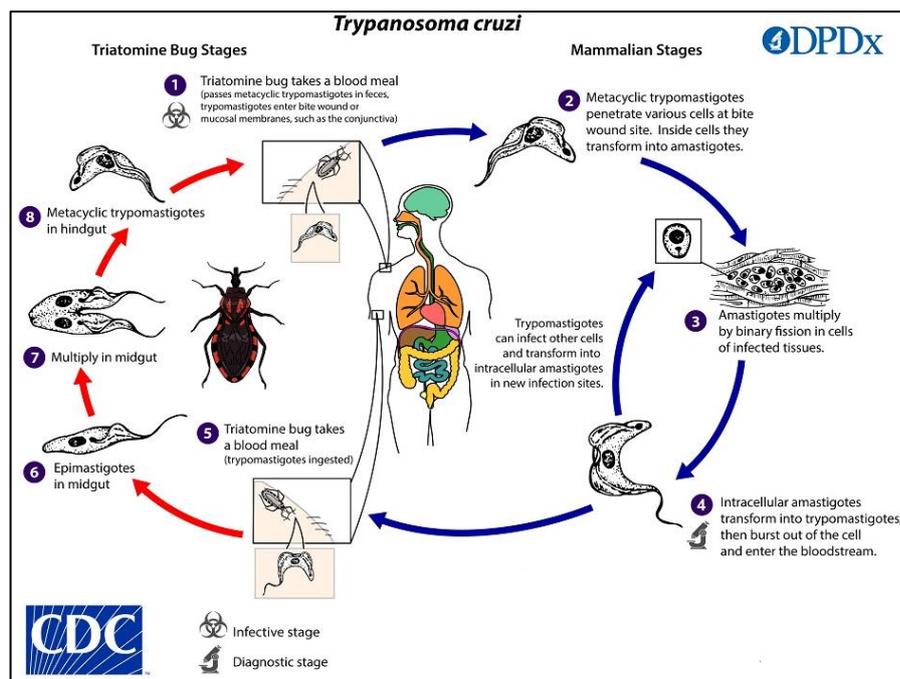


Figura 12 – Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: CDC, (2019).

2.2.3 Hospedeiros

O protozoário, *T. cruzi* pode infectar cerca de 70 gêneros e mais de 100 espécies de hospedeiros mamíferos (ZINGALES et al., 2012), entre animais silvestres

e domésticos, além do homem (DIAS et al., 2016; JANSEN et al., 2018; LEÇA JÚNIOR et al., 2013). Este protozoário está distribuído desde o sul dos Estados Unidos ao Sul da América Latina (BRENIÈRE et al., 2016).

Porém, considerando a via vetorial clássica de transmissão de *T. cruzi*, é importante diferenciar as fontes de alimentação das fontes de infecção. As fontes de infecção silvestres dos triatomíneos pertencem a sete diferentes ordens: Marsupialia, Edentata, Chiroptera, Carnovora, Lagomorpha, Rodentia e Primates. No ambiente domiciliar e peridomiciliar cães e gatos são os principais reservatórios. Já as galinhas são consideradas importantes fontes de alimentação no peridomicílio (AZAMBUJA; GARCIA, 2017)

Os marsupiais têm grande importância epidemiológica, por suas altas taxas de infecção natural por *T. cruzi* e alta sinantropia, podendo servir de elo entre o ciclo silvestre e doméstico (JANSEN et al., 2018). Além dos marsupiais, roedores também podem servir como elo entre os ciclos de transmissão (MARTINS et al., 2015).

No ambiente urbano, os cães e gatos são considerados os principais reservatórios de *T. cruzi* (AZAMBUJA E GARCIA, 2017, RAMIREZ et al, 2013). Os cães são considerados sentinelas sendo um importante indicativo da ocorrência do ciclo de transmissão. A infecção por *T. cruzi* foi detectada em cães em uma área com histórico de surtos agudos da doença de Chagas na Colômbia (JAIMES-DUEÑEZ et al., 2017). No Brasil, 11,5% dos cães foram soropositivos no estado do Rio Grande do Norte (FREITAS et al., 2018) e 38% no Ceará (BEZERRA et al., 2014). DNA de *T. cruzi* foi detectado em cães e gatos em ambiente urbano e periurbano no Pará (PEREIRA et al., 2021).

Em todos os biomas brasileiros foram registradas infecções por *T. cruzi* em mamíferos de vida livre. Em dados revisados por Jansen e colaboradores (2018), no bioma Caatinga, predominante da região nordeste brasileira, 17% dos mamíferos silvestres eram soropositivos e 8% apresentaram hemoculturas positivas, indicativo de alta parasitemia e conseqüentemente alto potencial de infecção. As cuícas (principalmente *Philander* spp.), quatis (*Nasua nasua*), primatas (*Sapajus libidinosus*, *Leontopithecus rosalia*) apresentaram as mais altas taxas de hemocultura positiva, os quirópteros a maior diversidade de genótipos e roedores da espécie *Ratus ratus* apresentaram 21% de hemoculturas positivas. No Cerrado a infecção por *T. cruzi* foi observada em *Didelphis albiventris*, *Oecomys cleberi*, *Rhipidomys macrurus* e *Gracilinanus agilis*. Nesta última espécie foi observada parasitemia patente, indicando

sua competência para infectar vetores ou outros mamíferos através da predação (BRANDÃO et al., 2019). Na Amazônia brasileira, DNA de *T. cruzi* foi detectado em *D. marsupialis* (PEREIRA et al., 2021) e em primatas das famílias Callitrichidae, Aotidae, Pitheciidae, Cebidae e Atelidae (BAHIA et al., 2017).

Recentemente, *T. cruzi*, genótipo TcII, foi isolado em diferentes tecidos (coração, intestino, fígado e músculo) de uma suindara (*Tyto furcata*) sugerindo uma infecção crônica, com base na presença de DNA do parasito em múltiplos órgãos, mas ausente no baço demonstrando o estabelecimento de *T. cruzi* em uma ave hospedeira. Para os autores, há a necessidade de investigar se mais espécies de aves podem ser infectadas por *T. cruzi* e se *T. furcata* tem um papel na disseminação, transmissão e/ou manutenção do parasito (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 2022).

2.3 Doença de Chagas

T. cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, uma enfermidade sistêmica que apresenta curso clínico bifásico, composto por uma fase aguda e uma fase crônica, que pode se manifestar nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (BRASIL, 2010; DIAS et al., 2016).

Esta enfermidade é endêmica em 21 países americanos e considerada um grave problema de saúde pública. Porém, mudanças epidemiológicas, principalmente devido a mobilidade populacional, urbanização e emigração, aumentaram os casos no Canadá, nos Estados Unidos, em muitos países europeus e alguns africanos, no Mediterrâneo Oriental e no Pacífico Ocidental (WHO, 2022).

Estima-se que em todo o mundo, aproximadamente, 75 milhões de pessoas vivem em área de risco, 6 a 7 milhões estejam infectadas, com cerca de 14.000 mortes por ano. Menos de 10% das pessoas são diagnosticadas e alguns poucos recebem o tratamento adequado (WHO, 2022).

No Brasil, a estimativa atual é de que pelo menos um milhão de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* (BRASIL, 2021). E, entre os anos de 2010 e 2020 foram registrados 49.574 óbitos por DC, destas, 11.210 ocorreram na região Nordeste, sendo 1.299 no estado de Pernambuco (BRASIL, 2022a). Durante o período de 2008 a 2020, foram confirmados 3.018 casos de DC aguda, sendo 94,47% na região Norte; 4% no Nordeste; 1% no Centro-Oeste; 0,40% no Sudeste e 0,13% na região Sul (BRASIL, 2022b).

No país, atualmente, distinguem-se três diferentes áreas de risco de transmissão de *T. cruzi*. Área extra-amazônica, endêmica inicialmente, com transmissão domiciliar por *T. infestans* interrompida, com risco, atualmente, limitado à presença de espécies nativas que podem constituir colônias intradomiciliares, mesmo após terem sido eliminadas. Outra área de risco é a amazônica, com transmissão enzoótica, oral, mais frequente pelo consumo de alimentos *in natura*. Por fim, área de transição, onde coexistem as duas situações, compreendendo os estados do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso (SILVEIRA, 2011; DIAS et al., 2016).

As vias de transmissão do parasito são a vetorial, oral, transfusional ou transplantes de órgãos, vertical (congênita) e acidental (DIAS et al., 2016). Além dessas, foi confirmada a presença de tripomastigotas no sêmen de indivíduos chagásicos, e a transmissão sexual experimental em camundongos foi comprovada (GOMES et al., 2019).

No Brasil, entre os anos de 2010 e 2020, foram notificados casos de DC aguda, cujas infecções ocorreram por via oral (77,09%), vetorial (7,9%), vertical (0,39%), acidental (0,18) e indeterminados/branco (14,15%) (BRASIL, 2022b). A transmissão oral é a mais frequente no país, principalmente, na região norte (MADEIRA et al., 2021), associado muitas vezes ao consumo de açaí contaminado, porém recentemente em 2020, um dos maiores surtos brasileiros foi registrado na região nordeste, na cidade de Ibimirim, Pernambuco. Este surto resultou em 30 pessoas infectadas e foi associado à alimentação, porém a fonte alimentar da infecção não foi identificada. Diferentes cenários epidemiológicos no país demonstram a necessidade de medidas de controle adequadas (JANSEN et al., 2020).

Os casos crônicos da DC são predominantes no Brasil e são decorrentes de infecções vetoriais de décadas passadas (BRASIL, 2015), dessa forma, o país concentra suas ações de combate à doença, no controle do vetor no ambiente domiciliar (BRASIL, 2021). O caráter enzoótico da DC, faz com que a infecção humana por via vetorial seja sempre possível e as demais formas de transmissão são dependentes daquela que naturalmente é produzida a partir do artrópode vetor, sejam domiciliados ou não (GALVÃO et al., 2014).

No Brasil eram notificados apenas os casos agudos da doença (BRASIL, 2010), porém, esta fase pode ser sintomática ou assintomática dependendo do estado imunológico do hospedeiro (NEVES, 2005), o que dificulta o diagnóstico e consequentemente aumenta a subnotificação. No entanto, conforme a Portaria nº 264,

de 17 de fevereiro de 2020, a DC crônica foi incluída na Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública (BRASIL, 2020). A adoção da notificação compulsória permitirá um maior dimensionamento da DC, tornando visíveis muitos casos, aprimorando os dados no sistema de informação para a melhoria de medidas preventivas e acesso ao tratamento adequado (MADEIRA et al., 2021).

O estado de Pernambuco está localizado em uma região originalmente de risco de transmissão vetorial e dessa forma concentra ações na vigilância entomológica e controle de vetores (PERNAMBUCO, 2013). Nesse estado a presença de triatomíneos foi registrada em 138 municípios e 91,3% capturados no intradomicílio (SILVA et al., 2012).

Porém, apesar da presença de triatomíneos positivos para flagelados semelhantes a *T. cruzi* e a vigilância entomológica ser de grande importância (SILVA et al., 2012, SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2017), no agreste pernambucano, estudos entomológicos com triatomíneos e sua frequência de infecção por *T. cruzi* ainda são incipientes.

3. Objetivos

3.1 Geral

Realizar levantamento entomológico de triatomíneos e caracterizar molecularmente as linhagens de *T. cruzi* que estão presentes nos vetores, em municípios do agreste de Pernambuco, Brasil.

3.2 Específicos

Identificar as espécies de triatomíneos capturados nos municípios da área de estudo.

Detectar a frequência da infecção natural por *T. cruzi* e suas linhagens nos triatomíneos capturados.

Identificar os municípios de maior ocorrência de triatomíneos infectados por *T. cruzi* e maior risco da infecção por este protozoário.

4. Referências bibliográficas

ABOLIS, N. G. et al. *Trypanosoma cruzi* I–III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. **Acta Tropica**, v. 120, p. 167-172, 2011.

ALENCAR, M. J. et al. Surveillance of Chagas disease vectors in Ceará State, Northeastern Brazil. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 9, p. 1-7, 2021.

ALEVI, K. C. C. et al. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens**, v. 10, p. 1-20, 2021.

ARGOLO, A. M. et al. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 68p.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. Portal Doença de Chagas: **Ciclo Evolutivo**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>> Acesso em: 10 de agosto, 2019.

BAHIA, M. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in captive Neotropical primates in the Brazilian Amazon. **American Journal of Primatology**, v. 79, p. 1-6, 2017.

BARATA, J. M. S. **Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)**. In: Carcavallo, R. U. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p. 409–448.

BARBOSA-SILVA, A. N. 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.

BARBOSA-SILVA, A. N. et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1-8, 2019.

BARROS, F. N. L. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines (Hemiptera: Reduviidae) from rural areas of the state of Pará, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 68, p. 868–875, 2021.

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.

BEZERRA, C. M. et al. Fast recovery of house infestation with *Triatoma brasiliensis* after residual insecticide spraying in a semiarid region of Northeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-17, 2020.

BEZERRA, C. M. et al. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: Food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

BRANDÃO, E. M. V. et al. Trypanosomatids in small mammals of an agroecosystem in Central Brazil: another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape. **Pathogens**, v. 8, p. 1-15, 2019.

BRASIL, Diário Oficial da União. Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020. **Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública**, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. **Doença de Chagas, 14 de abril, Dia Mundial**, Ano 2, 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico: **Controle vetorial das Leishmanioses, doença de Chagas e malária e a distribuição de insumos no território nacional**, v. 51, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/arquivos/boletim-epidemiologico-2013-volume-51-2013-no-26-2013-2020-controle-vetorial-das-leishmanioses-doenca-de-chagas-e-malaria-e-a-distribuicao-de-insumos-no-territorio-nacional.pdf/view>>. Acesso em: 15 de julho, 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico: **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**, v. 46, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. DATASUS. **Doença de chagas aguda - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. 2022b. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/chagasbr.def>>. Acesso em: 22 de abril, 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias**, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Sala de Apoio a Gestão Estratégica. **Mortalidade - Óbitos p/Residênc por Ano do Óbito segundo Região/Unidade da Federação Causa - CID-BR-10: ... 026 Doença de Chagas**. 2022a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 22 de abril, 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde** [recurso eletrônico]. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, 2016.

BRITO C. M. M, et al. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1111-1117, 2008.

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.

CANDIDO, A. S. et al. Ocorrência de triatomíneos em ambientes intra e peridomiciliares do Município de Campos Sales, Ceará. **Biota Amazônia**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2019.

CARANHA, L. et al. Estudo das fontes alimentares de *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 347–351, 2006.

CARBAJAL DE LA FUENTE, A. L. et al. Behavioral plasticity of triatominae related to habitat selection in Northeast Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 2008. v. 45, n. 1, p. 14–9.

CARBAJAL DE LA FUENTE, A. L. et al. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 101, n. 2, p. 115–119, 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1–70, 1909.

COMINETTI, M. C. et al. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 747–755, 2014.

COSTA, A. P. et al. *Trypanosoma cruzi* in Triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões, Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 445–451, 2018.

COSTA, J. et al. Do the new triatomine species pose new challenges or strategies for monitoring Chagas disease? An overview from 1979-2021. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, 2021.

COSTA, J. et al. Ecotopes, Natural Infection and Trophic Resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 7–13, 1998.

DARIO, M. A. et al. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* samples derived from *Triatoma vitticeps* and *Panstrongylus geniculatus* of the atlantic rainforest, Southeast Brazil, **Parasite**, v. 25, 2018.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. V. L. et al. Spatial distribution of triatomines in domiciles of an urban area of the Brazilian Southeast Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 43-50, 2016a.

DIOTAIUTI, L. Portal Doença de Chagas: **Fisiologia – Ecologia de vetores**. 2017. Disponível em: < <http://chagas.fiocruz.br/fisiologia/> > Acesso em: 11 de agosto, 2019.

DOS SANTOS, S. M. et al. Entomological survey in the state of Piauí, Northeastern Brazil, reveals intradomiciliary colonization of *Triatoma brasiliensis macromelasoma*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, 2017.

FARIAS, A. D. S. C. et al. Entomological research of triatomine species found in the rural area of Caruaru, Pernambuco State, Brazil, from 2011 to 2012. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, p. 1-6, 2019.

FIDALGO, A. S. O. D. B. V. et al. Insect vectors of chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174–182, 2018.

FREITAS, S. P. C. et al. Influência de hábitos antropicos na dispersão de *T. pseudomaculata*, através de *Mimosa tenuiflora*. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 333–336, 2004.

FREITAS, Y. B. N. et al., Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 190-197, 2018.

GALVÃO, C. Portal Doença de Chagas: **Sistemática**. 2017. Disponível em: < <http://chagas.fiocruz.br/sistemática-2/>> Acesso em: 04 de julho de 2019.

GALVÃO, C.; DE PAULA, A. S. **Sistemática e evolução dos vetores**. In: GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 26 –32.

GALVÃO, C.; JURBERG, J. Introdução: **Histórico**. In: GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 5 – 9.

GAUNT, M.; MILES, M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 557–565, 2000.

GIRÓN, I. G. et al. **Morfologia e anatomia externa**. In: Carcavallo, R. U. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 53–84.

GOMES, C. et al. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 81-84, 2019.

GONÇALVES, T. C. M.; COSTA, J. Portal Doença de Chagas: **Morfologia externa**. 2017. Disponível em: < <http://chagas.fiocruz.br/morfologia/>> Acesso em: 11 de agosto, 2019.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution of chagas disease vectors in brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

HONORATO, N. R. M. et al. Triatomine and *Trypanosoma cruzi* discrete typing units distribution in a semi-arid area of northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 220, p. 1-9, 2021.

JAIMES-DUEÑEZ, J. et al. Molecular and serological detection of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggests potential transmission risk in areas of recent acute Chagas disease outbreaks in Colombia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 141, p. 1-6, 2017.

JANSEN, A. M. et al. Portal Doença de Chagas: **Biogeografia – DTUs**. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/biogeografia/> Acesso em: 15 de dezembro, 2019.

JANSEN, A. M., XAVIER, S., ROQUE, A. Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1-15, 2020.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1-25, 2018.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1-25, 2018.

JUNQUEIRA et al., **Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública**, 300p., 2011.

JURBERG, J. et al. **Atlas icográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas)**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2017. 62 p.

JURBERG, J. et al. **Uma iconografia dos Triatomíneos**. Rio de Janeiro: Co-edição Hill Edirions e Editora Gama Filho, 2005.

KROPF, S. P.; SA, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde**, v. 16, p. 13-34, 2009.

LAZZARI, C. R. **Biologia e Comportamento**. In: GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 64–74.

LEÇA JUNIOR, N. F. et al. First report of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from southern Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 182-185, 2013.

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**, v. 163, n. 3, p. 127–520, 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? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1456–1459, 2017.

LIMA-NEIVA, V. et al. The connection between *Trypanosoma cruzi* transmission cycles by *Triatoma brasiliensis brasiliensis*: A threat to human health in an area susceptible to desertification in the Seridó, Rio Grande do Norte, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-21, 2021.

LIMA-OLIVEIRA, T. M. et al. Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrocchiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. **Acta Tropica**, v. 201, 2020.

LOROSA, E. et al. Preferência alimentar de ninfas de 1º estágio de algumas espécies de triatomíneos do complexo Oliveirai (Hemiptera, Reduviidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 10, n. 2, p. 163–170, 2008.

LOROSA, E. S. et al. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomologia y Vectores**, v. 7, n. 3, p. 287-296, 2000.

MADEIRA, F. P. et al. Chagas Disease in the Western Brazilian Amazon: epidemiological overview from 2007 to 2018. **Journal of Human Growth and Development**, v. 31, p. 84-92, 2021.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. **The Lancet Microbe**, 2022.

MARCILI, A., et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641-655, 2009.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F. et al. *Trypanosoma cruzi*, beyond the dogma of non-infection in birds. **Infection, genetics and evolution**, v. 99, 2022.

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 Diseases**, v. 39, p. 68–75, 2015.

MELO, C. M. et al. Triatomine fauna and recent epidemiological dynamics of Chagas disease in an endemic area of Northeast Brazil. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

MINUZZI-SOUZA, T. T. C. et al. Synanthropic triatomines as potential vectors of *Trypanosoma cruzi* in Central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 824-828, 2017.

MONSALVE-LARA, J. et al. The risk of oral transmission in an area of a Chagas disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. **Acta Tropica**, v. 215, p. 1-9, 2021.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11^a ed, São Paulo, Atheneu, 2005.

NIELEBOCK, M. A. P. et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. **PLoS ONE**, p. 1-15, 2020.

PARENTE, C. C. et al. Community-based entomological surveillance reveals urban foci of chagas disease vectors in Sobral, State of Ceara, Northeastern Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 2017.

PEREIRA, H. S. et al. Chagas disease in urban and peri-urban environment in the Amazon: Sentinel hosts, vectors, and the environment. **Acta Tropica**, v. 217, 2021.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR – 2011 / 2014** /Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde – Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2013.

RABINOVICH, J. E. et al. Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 479–494, 2011.

RAMÍREZ, J. D. et al. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 2016-219, 2013.

RAMÍREZ, J. D., et al. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to Tcbat genotype. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, p. 477-479, 2014.

REY, L. **Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas**. In: Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 27-41, 2008.

RIBEIRO, A. R. et al. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 183–189, 2016.

RIBEIRO, A. R., et al. Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 453-463, 2018.

RIBEIRO-JÚNIOR, G. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi* infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-10, 2019.

ROCHA, D. S.; SANTOS, C. M. **Morfologia dos ovos e ninfas**. In: GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 40 –63.

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

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.

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.

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.

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, T. R. M. et al. Spatial distribution of triatomine bugs in a chagas disease endemic region in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–5, 2019.

SILVEIRA, A. C. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. **História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, v. 44: Suplemento II, p. 122-124, 2011.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2017.

VALENÇA-BARBOSA, C. et al. Genotypic *Trypanosoma cruzi* distribution and parasite load differ ecotypically and according to parasite genotypes in *Triatoma brasiliensis* from endemic and outbreak areas in Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 222, p. 1-10, 2021.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 994–997, 2015.

VASCONVELOS, L. A. S. et al. *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit TcIV implicated in a case of acute Chagas disease in a domiciliated dog in the western Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1-4, 2020.

WANIEK, P. J. et al. First genotyping of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected *Triatoma juazeirensis*, *Triatoma melanica* and *Triatoma sherlocki* from Bahia State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 1-7, 2020.

WHO – World Health Organization, 2022. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1 > Acesso: 22 abril de 2022).

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZINGALES, B. Portal Doença de Chagas: Taxonomia: **Bioquímica e Molecular – Métodos Bioquímicos e Moleculares**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/taxonomia/>> Acesso em: 21 de setembro, 2019.

CAPÍTULO 1

Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region from Brazil

(**Anexo 1**: artigo publicado no periódico, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0278-2019>)

Distribuição espacial de triatomíneos em uma região endêmica para doença de Chagas no Brasil

Resumo

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (DC), uma infecção zoonótica transmitida por vetores triatomíneos ao homem. Embora a história dessa infecção parasitária tenha nascido no Brasil e aqui tenha dado um grande avanço na informação, o mesmo não pode ser dito sobre a real distribuição do triatomíneo em várias áreas deste país. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de espécies de triatomíneos em uma região endêmica para DC no Nordeste do Brasil. Foi realizado um estudo retrospectivo com dados obtidos de 2008 a 2017. Todas as informações foram fornecidas pela V Gerência Regional de Saúde do estado de Pernambuco. A distribuição espacial das espécies de triatomíneos foi analisada por meio de um mapa utilizando o sistema de informação geográfica Quantum. Um total de 4.694 espécimes de triatomíneos ($469,4 \pm 221,2$ por ano) foram coletados no período 2008-2017, sendo 94,5% (4.434/4.694) no intradomicílio e 5,5% (260/4.694) no peridomicílio. Dentre os artrópodes coletados, 92,5% (4.340/4.694) e 7,5% (354/4.694) eram adultos e ninfas, respectivamente. As espécies mais frequentemente detectadas foram *Panstrongylus lutzi* (30,36%), *Triatoma brasiliensis* (26,12%), *Triatoma pseudomaculata* (22,43%) e *Panstrongylus megistus* (20,54%). Esses dados contribuem para um melhor entendimento da distribuição da infecção por *T. cruzi* na região Nordeste do Brasil. Medidas preventivas baseadas no controle de vetores devem ser implementadas na área de estudo para reduzir a frequência desta doença tropical negligenciada.

Palavras-chave: Vetor. Tripanossomíase americana. Epidemiologia. Brasil.

Introdução

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) é reconhecido como o agente etiológico da doença de Chagas (DC). Atualmente, essa infecção parasitária é considerada uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas e uma grande ameaça à saúde pública, com incidência anual de 28.000 casos e até 12.000 mortes somente nas Américas¹. A transmissão da DC depende da ocorrência de vetores triatomíneos (*Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius robustus*), que eliminam a forma infectante do protozoário (tripomastigotas metacíclicas) em seus fluidos fecais, que são detectados próximos ao local da picada após uma refeição de sangue. Alternativamente, *T. cruzi* entra em contato com hospedeiros vertebrados através de membranas mucosas intactas, como a conjuntiva². Além disso, nos últimos anos, outras vias de transmissão, como transfusão de sangue, transplante de órgãos e transmissão transplacentária e oral, adquiriram importância³.

Os vetores de *T. cruzi* são insetos hematófagos (Reduviidae: Triatominae) pertencentes a um grupo de 148 espécies, das quais 65 ocorrem no Brasil². Aproximadamente dez espécies são epidemiologicamente importantes para a transmissão de DC⁴. No Brasil, a presença desses reduvídeos tem sido relatada em diferentes regiões, pois são adaptados a diferentes ecótopos^{5,6}. Esses espécimes podem viver em ambientes intradomiciliares e peridomiciliares^{7,8}. Os ecótopos peridomiciliares, incluindo instalações de animais e restos de construções, desempenham um papel importante como ponte entre os ciclos doméstico e selvagem da doença^{8,9}.

Até o momento, alguns levantamentos epidemiológicos foram realizados em diferentes regiões brasileiras. Por exemplo, na região Sudeste, *P. megistus* foi recuperado em áreas urbanas¹⁰, enquanto no Sul do Brasil, *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria*¹¹ foram relatados como as espécies mais comumente detectadas. Na região Nordeste espécies como *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus lutzi* e *Triatoma pseudomaculata* são frequentemente relatadas^{7,9,12}. É importante ressaltar que vários ambientes naturais nesta região, como árvores xerófilas e rochas, são habitados por triatomíneos¹³.

Dados sobre a distribuição desses vetores são necessários para melhor compreender os aspectos epidemiológicos relacionados à transmissão da DC e direcionar intervenções preventivas⁷. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência e distribuição de espécies de triatomíneos em uma região endêmica para DC no Nordeste do Brasil.

Métodos

Área de estudo

O estudo foi realizado na microrregião de Garanhuns (Latitude 8°53'27" Sul e Longitude 36°29'48" Oeste), estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (Figura 1). A área compreende 21 municípios e é caracterizada por um clima semiárido com temperatura média anual de 22°C (17 - 30°C), precipitação média anual de 147 mm (25 - 295 mm) e umidade relativa do ar de 90%.

De 2007 a 2015, foram registrados 773 casos da DC na área de estudo, com média anual de 85,8 casos por ano¹⁴.

Delineamento do estudo e análise dos dados

Foi realizado um estudo retrospectivo com dados obtidos de 2008 a 2017. Todos os dados foram fornecidos pela V Gerência Regional de Saúde do estado de Pernambuco, e foram retirados do Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas.

Foram obtidas informações sobre a espécie do vetor, estágio de vida, área de captura e município, e calculadas as frequências absolutas e relativas. Além disso, o teste Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates (nível de significância de 5%) foi utilizado para comparar a positividade entre espécies e área de captura (intradomicílio ou peridomicílio) e entre estágios e área de captura. O software BioEstat (versão 5.3) foi utilizado para essas análises¹⁵.

A distribuição espacial das espécies de triatomíneos foi analisada por meio de um mapa utilizando o sistema de informação geográfica Quantum (QGIS 3.2 BONN). O método de

otimização de Jenks foi utilizado para organizar os dados e, posteriormente, construir um histograma de frequências para identificar os agrupamentos¹⁶.

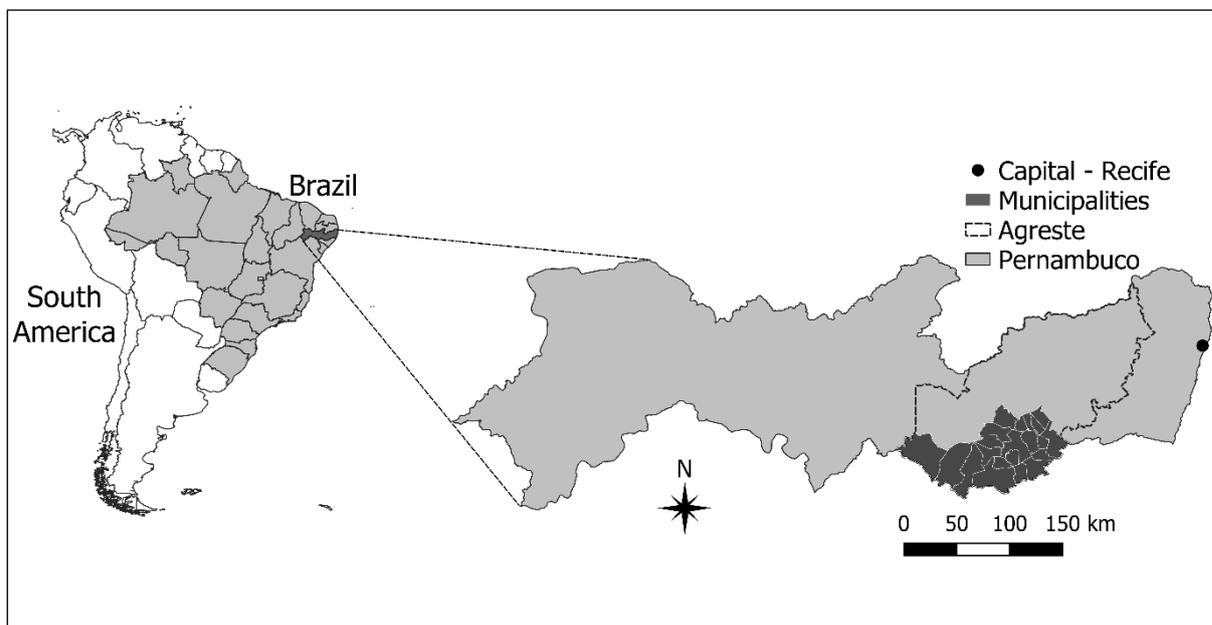


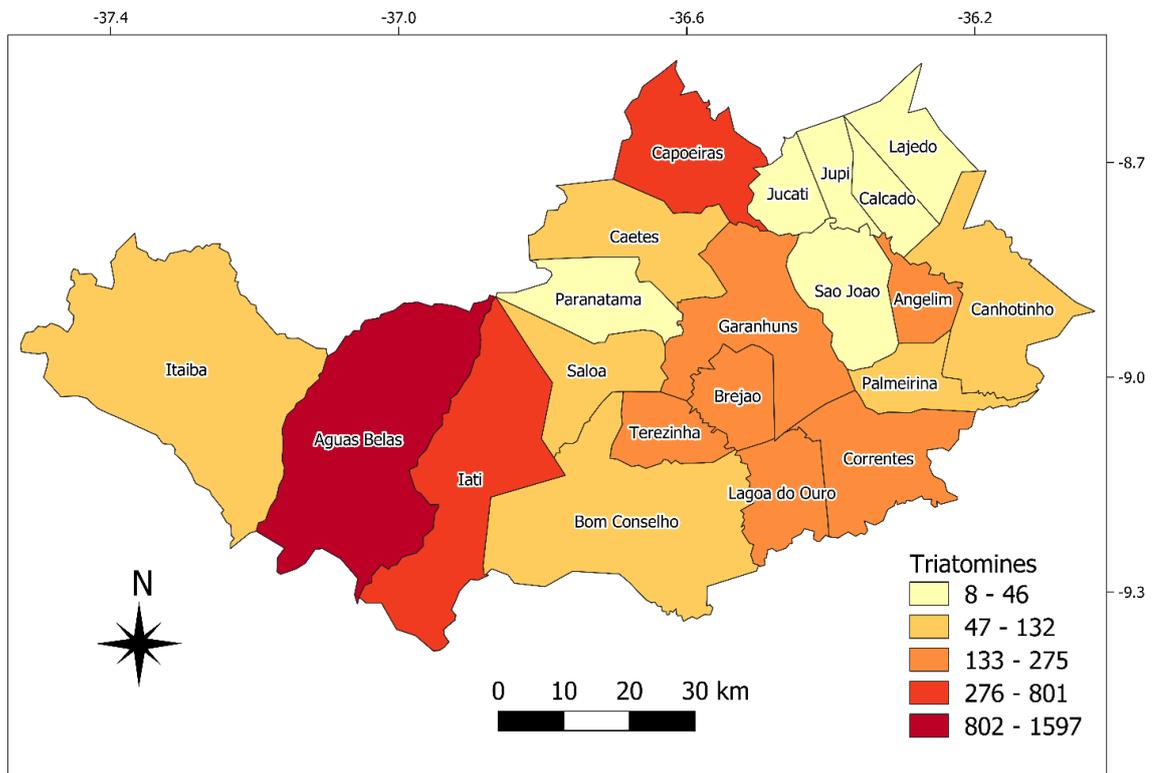
FIGURA 1: Área de estudo localizada na microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Resultados

Um total de 4.694 espécimes de triatomíneos ($469,4 \pm 221,2$ por ano) foram coletados durante o período de estudo, sendo 94,5% (4.434/4.694) e 5,5% (260/4.694) dos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar, respectivamente. Uma diferença altamente significativa foi observada entre as espécies mais comuns e área de captura ($\chi^2 = 50,363$; $p = 0,0000$), e entre fases de vida e área de captura ($\chi^2 = 112,496$; $p = 0,0000$). O maior número de espécimes coletados em um único ano (17,3%; 870/4.694) foi obtido em 2008. De todos os invertebrados coletados, 92,5% (4.340/4.694) e 7,5% (354/4.694) eram adultos e ninfas, respectivamente (Tabela 1). As espécies de reduvídeos mais relatadas foram *P. lutzi* (30,36%), *T. brasiliensis* (26,12%), *T. pseudomaculata* (22,43%) e *P. megistus* (20,54%) (Tabela 1).

TABELA 1: Espécies de triatomíneos coletadas em áreas intra e peridomiciliares de 2008 a 2017.

| ESPÉCIES | Intradomicílio | | | Peridomicílio | | | Total | Frequência relativa (%) |
|--------------------------------|----------------|------------|--------------|---------------|-----------|------------|--------------|-------------------------|
| | adultos | ninfas | total | adultos | ninfas | total | | |
| <i>Panstrongylus lutzi</i> | 1375 | 14 | 1389 | 36 | 0 | 36 | 1425 | 30,36 |
| <i>Triatoma brasiliensis</i> | 968 | 194 | 1162 | 44 | 20 | 64 | 1226 | 26,12 |
| <i>Triatoma pseudomaculata</i> | 943 | 39 | 982 | 42 | 29 | 71 | 1053 | 22,43 |
| <i>Panstrongylus megistus</i> | 834 | 43 | 877 | 72 | 15 | 87 | 964 | 20,54 |
| <i>Triatoma</i> spp. | 12 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0,09 |
| <i>Triatoma melanocephala</i> | 8 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0,25 |
| <i>Rhodnius</i> spp. | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0,09 |
| <i>Panstrongylus</i> sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0,02 |
| <i>Triatoma infestans</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0,02 |
| TOTAL | 4.144 | 290 | 4.434 | 196 | 64 | 260 | 4.694 | 100 |

**FIGURA 2:** Distribuição dos triatomíneos coletados na área de estudo de 2008 a 2017.

Discussão

Este estudo relata a ocorrência de vetores da DC em áreas intradomiciliares e peridomiciliares de uma região endêmica do Nordeste do Brasil. A porcentagem de espécimes coletadas em áreas intradomiciliares é semelhante a um estudo anterior realizado na mesma

área, onde 92,4% dos triatomíneos foram coletados no intradomicílio¹⁷. Esses invertebrados geralmente vivem em ambientes silvestres, porém devido à degradação de seus habitats naturais, triatomíneos sinantrópicos são frequentemente relatados¹⁸. Esses artrópodes são atraídos por fontes de luz em áreas intradomiciliares¹⁹ ou podem ser transportados passivamente por madeiras acumuladas ou tijolos, que podem servir de abrigo para os vetores e animais sinantrópicos, como marsupiais e roedores^{9,20}.

Na área de estudo, a vigilância desses vetores ocorre tanto de forma ativa quanto passiva. Durante o período de estudo (2008 a 2017) foi observada uma redução gradativa no número de espécimes, o que pode estar relacionado a uma melhora nas condições sanitárias da população. No entanto, o risco de dispersão de vetores aumenta com a diminuição da vigilância.

Tanto as ninfas quanto os adultos foram coletados em áreas intradomiciliares e peridomiciliares. A dispersão dos triatomíneos em diferentes ambientes pode estar relacionada ao acasalamento ou à busca por alimento¹⁹. Neste estudo, a presença de ninfas no intradomicílio indica a formação de colônias nestes ambientes, representada pelo fenômeno de domiciliação e, conseqüentemente, alto risco de infecção humana^{7,12}.

Várias espécies foram capturadas durante o estudo (*P. lutzii*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *P. megistus*), sendo *P. lutzii* a mais frequente (30,36%). Essa espécie já havia sido detectada em outras regiões brasileiras^{12,17}, e é relevante para a persistência da DC em áreas endêmicas²¹. Do ponto de vista epidemiológico, *P. lutzii* desempenha um papel crucial na dinâmica da infecção por *T. cruzi* no Nordeste do Brasil, uma vez que se alimenta de uma grande variedade de hospedeiros (aves, roedores, marsupiais, cães, cabras e humanos), muitos dos quais são comumente encontrados na área de estudo⁹. Por outro lado, *T. brasiliensis*, aparentemente associado a roedores, tem sido considerado um dos mais importantes vetores de *T. cruzi* no Brasil, utilizando como abrigo a espécie de cacto *Pilosocereus gounlei* habitualmente encontrada na região Nordeste²².

Da mesma forma, *T. pseudomaculata* e *P. megistus* compartilham habitat natural e hospedeiros semelhantes. Curiosamente, *T. pseudomaculata* foi capturado em ecótopos silvestres de *Mimosa tenuiflora* (popularmente conhecida como jurema-preta), uma vegetação nativa encontrada na área de estudo²⁰. Embora com menor frequência, espécies do gênero *Rhodnius* foram detectadas na área do presente estudo¹⁷.

Os achados contribuem para uma melhor compreensão da dinâmica da DC na região Nordeste do Brasil. A má qualidade dos materiais habitacionais e das moradias, principalmente nas áreas rurais, proporciona um ambiente favorável à proliferação de vetores triatomíneos. Infelizmente, a transmissão vetorial da DC no Brasil ainda ocorre, e a domiciliação dos vetores observada neste estudo é um fator de risco para a ocorrência da doença. Portanto, medidas preventivas baseadas no controle vetorial devem ser implementadas na área de estudo para reduzir a incidência da DC.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Maria L. R. Rodrigues (V Gerência Regional de Saúde) pelo fornecimento dos dados.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Este artigo é baseado na tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) da primeira autora, desenvolvida na Universidade Federal Rural de Pernambuco, com apoio de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. Pan American Health Organization. Chagas disease [Internet]. Washington: Pan American Health Organization; 2019 [cited 2019 May 20]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40242&lang=en
2. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. 289p.
3. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(3):277-282.
4. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, et al. Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil - vetores da doença de Chagas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2014. 58p.
5. Parente CC, Bezerra FSM, Parente PI, Dias-Neto RV, Xavier SCC, Ramos Jr AN, et al. Community-Based Entomological Surveillance Reveals Urban Foci of Chagas Disease Vectors in Sobral, State of Ceará, Northeastern Brazil. PLoS One. 2017;1-11.
6. Dias JVL, Queiroz DRM, Martins HR, Gorla DE, Pires HHR, Diotaiuti L. Spatial distribution of triatomines in domiciles of na urban area of the Brazilian Southeast Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(1):43-50.
7. Fidalgo ASOBV, Costa AC, Silva Filho J D, Cândido DS, Freitas EC, Pereira LS, et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2018;51(2):174-82.
8. Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T.*

pseudomaculata and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments.

Parasitol Res. 2012; 110(4):1481-5.

9. Silva MBA, Menezes KR, Farias MCG, Andrade MS, Victor CCA, Lorosa ES, et al. Description of the feeding preferences of triatomine in the Chagas disease surveillance study for the State of Pernambuco, Brazil (Hemiptera: Reduviidae). Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(4):543-6.

10. Ribeiro AR, Oliveira RC, Ceretti Junior W, Lima L, Almeida LA, Nascimento JD, et al. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(2):183-9.

11. Ribeiro AR, Mendonça VJ, Alves RT, Martinez I, Araújo RF, Mello F, et al. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Saude Publica. 2014;48(2):295-302.

12. Melo CM, Cruz ACFG, Lima AFVA, Silva LR, Madi RR, Jeraldo VL, et al. Triatomine fauna and recent epidemiological dynamics of Chagas disease in an endemic area of Northeast Brazil. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018; 2018:1-13.

13. 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(1):14-9.

14. Ministério da Saúde (MS). Sistema de Informação de Atenção Básica – SIAB. Cadastro familiar, Pernambuco. DATASUS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015 [cited 2019 Jan 10]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?siab/cnv/SIABFPE.def>.

15. Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT – statistical applications on the biomedical sciences. Ong. Mamirauá. 2007.
16. Ramos APM, Marcato Junior J, Decanini MMS, Pugliesi EA, Oliveira RF, Paranhos Filho C. Avaliação qualitativa e quantitativa de métodos de classificação de dados para o mapeamento coroplético. Rev Bras Cartogr. 2016;68(3):609-29.
17. Silva MBA, Barrero 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(1):60-5.
18. 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(6):747-55.
19. Carbajal De La Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo M. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. Acta Trop. 2007;101(2):115-9.
20. Freitas SPC, Freitas ALC, Prazeres SM, Gonçalves TCM. Influência de hábitos antrópicos na dispersão de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, através de *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) no Estado do Ceará, Brasil. Cad Saúde Pública. 2004;20(1):333-6.
21. Caranha L, Lorosa ES, Rocha DS, Jurberg J, Galvão G. Estudo das fontes alimentares de *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado do Ceará. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(4):347-51.

22. Valença-Barbosa C, Lima MM, Sarquis O, Bezerra CM, Abad-Franch F. Short Report: A common Caatinga cactus, *Pilosocereus gounellei*, is an important ecotope of wild *Triatoma brasiliensis* populations in the Jaguaribe Valley of Northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(6):1059-62.

CAPÍTULO 2

Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs of the triatomine species in a Chagas disease endemic area

(**Anexo 2:** artigo publicado no periódico, *Journal of Parasitic Diseases*, v. 46, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01418-6>)

**Caracterização molecular de DTUs de *Trypanosoma cruzi*
de espécies de triatomíneos em área endêmica para doença de Chagas**

Resumo

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (DC), uma infecção tropical negligenciada com grande importância para a saúde pública. Este protozoário possui insetos triatomíneos como vetor, mas também pode ser transmitido por transfusão de sangue, transplantes de órgãos, ingestão de alimentos, ou congenitamente. Possui uma população heterogênea classificada em *Discrete Typing Units* (DTUs), TcI–TcVI e TcBat. O objetivo deste estudo foi caracterizar molecularmente as DTUs de *T. cruzi* em triatomíneos de uma área endêmica para a DC no Nordeste do Brasil. Triatomíneos foram coletados e o conteúdo intestinal foi microscopicamente analisado para investigar a presença de flagelados tripanosomatídeos. Além disso, os tratos digestivos de alguns espécimes foram dissecados e analisados molecularmente por PCR e sequenciamento para *Trypanosoma* spp. Amostras positivas na PCR foram posteriormente submetidas a uma multiplex PCR para caracterizar DTUs de *T. cruzi*. Um total de 117 triatomíneos foram coletados, sendo 93,16% no intradomicílio e 6,84% em ambientes peridomiciliares. Os insetos foram identificados como *Panstrongylus lutzi* (37,60%), *Triatoma pseudomaculata* (26,50%), *Triatoma brasiliensis* (23,08%) e *Panstrongylus megistus* (12,82%). Os exemplares aqui analisados apresentaram taxas de infecção por *T. cruzi* de 5,49% e 12,09% em exames parasitológicos e moleculares, respectivamente. A triagem por PCR multiplex revelou 70,59% do genótipo TcI, detectado em todas as espécies de triatomíneos identificadas neste estudo e 29,41% de DTU TcIII/TcIV detectado em *P. megistus* e *P. lutzi*. *T. cruzi* infecta triatomíneos em ambientes intradomiciliares e peridomiciliares, o que chama a atenção para o risco de infecções humanas e para a importância da implementação da vigilância e ações de controle entomológico.

Palavras-chave Unidades de tipagem discreta. Triatominae, Vetores da doença de Chagas, Nordeste do Brasil

Introdução

Protozoários da Família Trypanosomatidae tem sido causa de importantes doenças de interesse em saúde pública há algum tempo. Dentre esses parasitos, *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) foi identificado como o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana, uma zoonose tropical negligenciada ainda presente na América Latina. Insetos (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae) atuam como vetores desse protozoário, principalmente em países em desenvolvimento onde as más condições de habitação facilitam a infestação por estes triatomíneos (Barbosa-Silva et al. 2019). Também podem ser transmitidos via transfusão de sangue, transplante de órgãos, ingestão de alimentos e congenitamente. Atualmente, acredita-se que aproximadamente 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, com mais de 10.000 mortes por ano (OMS 2021).

Sabe-se que *T. cruzi* possui uma população heterogênea com uma diversidade genética atualmente classificada em *Discrete Typing Units* (DTUs), denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat (Marcili et al. 2009a; Zingales et al.2009, 2012). No Brasil, todas as DTUs foram relatadas em diferentes biomas (Jansen et al. 2018) e isolados de hospedeiros selvagens e domésticos (Marcili et al. 2009b; Bezerra et al. 2014; Jansen et al. 2018), bem como de triatomíneos coletados em habitats domésticos ou silvestres (Cominetti et al. 2014; Martins et al. 2015; Ribeiro et al. 2016; Barbosa- Silva et al. 2016; Bezerra et al. 2018; Jansen et al. 2018; Lima-Oliveira et al. 2020).

TcI tem uma ampla distribuição geográfica em todo o continente americano e diferentes mamíferos (gambás, roedores, primatas e tamanduás) e espécies de triatomíneos [por exemplo, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma*

pseudomaculata Corrêa & Espínola, 1964, *Rhodnius nasutus* Sta^ol, 1859, *Rhodnius pictipes* Sta^ol, 1872] estão envolvidos no ciclo silvestre (Zingales et al. 2012; Zingales 2018). A DTU TcI, também, foi isolada de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) (Bezerra et al. 2014).

Por outro lado, TcII é predominantemente encontrada nas regiões sul e central da América do Sul, sendo raramente relatado na América do Norte (Zingales 2018). Esta DTU foi detectada especialmente em morcegos, primatas, roedores, marsupiais, quatis (Jansen et al. 2015, 2018); e vetores triatomíneos (Lilioso et al. 2017; Dario et al. 2018).

TcIII está geograficamente distribuído do nordeste da Venezuela à Argentina, sendo predominantemente associada ao ciclo silvestre (Zingales, 2018). Esta DTU é comumente encontrada em ecótopos terrestres e fossoriais, tendo tatus dos gêneros *Dasybus*, *Chaetophractus* e *Euphractus* atuando como principais reservatórios (Zingales et al. 2012; Zingales 2018), mas também podem ser encontrados em marsupiais (por exemplo, *Didelphis* spp., *Monodelphis* spp.), roedores (por exemplo, *Galea spixii*) e humanos (Abolis et al. 2011; Zingales et al. 2012; Martins et al. 2015). Da mesma forma, TcIV é principalmente relacionada com o ciclo silvestre, sendo relatada na América do Norte e do Sul. Os principais hospedeiros desta DTU na América do Sul são primatas selvagens e quatis (*Nasua nasua*) e os guaxinins atuam como reservatórios importantes na América do Norte (Zingales 2018).

TcV e TcVI são raros no ciclo selvagem e dados sobre seus hospedeiros são escassos. Há alguns relatos em hospedeiros mamíferos do gênero *Dasybus*, *Euphractus* e *Octodon* (Zingales et al. 2012). No Brasil, TcVI foi isolado em *T. brasiliensis* (Lima-Oliveira et al. 2020), e ambas as DTUs (TcV e TcVI) foram associadas à cardiomiopatia e megassíndromes em humanos (Zingales et al. 2012). Por último, o TcBat foi isolado de *Myotis* spp., *Noctilio* sp., humanos (Marcili et al. 2009a; Ramírez et al. 2014), e foi detectado em *Triatoma sordida* (Sta^ol, 1859) (Cominetti et al. 2014).

Apesar de todos os esforços do Serviço de Saúde Brasileiro, a doença Chagas ainda é um problema para as populações indígenas vivendo em áreas endêmicas. Em algumas regiões, a domiciliação de espécies de triatomíneos aumenta o risco de infecção, como tem sido observado com o aumento de relatos de infecção por *T. cruzi* em cães nos últimos cinco anos. Portanto, investigações sobre vetores naturalmente infectados por *T. cruzi*, bem como a caracterização genotípica deste protozoário contribuem para o entendimento da ecoepidemiologia da doença de Chagas, facilitando as decisões sobre medidas preventivas para reduzir o risco de infecções humanas e animais. O objetivo deste estudo foi detectar diferentes DTUs de *T. cruzi* em triatomíneos de uma área endêmica da doença de Chagas no Nordeste do Brasil.

Métodos

Área de estudo

O estudo foi realizado no estado de Pernambuco, Região Nordeste do Brasil (Fig. 1). A área é composta por 21 municípios pertencentes à microrregião de Garanhuns (Latitude 8°53'27" Sul e Longitude 36°29'48" Oeste), caracteriza-se por um clima semiárido com temperatura média anual de 22° C (variando de 17° C a 30° C), precipitação média de 147 mm (variando de 25 a 295 mm) e umidade relativa do ar de 90%. Todas as comunidades rurais desta região têm paisagens semelhantes, com residências localizadas próximas a fragmentos florestais e a presença de palmeiras nativas. Cães, gatos e galinhas são frequentemente relatados nesses domicílios.

Coleta de triatomíneos e identificação morfologia

De julho de 2018 a junho de 2019, espécimes de triatomíneos foram coletados ativamente com o auxílio de pinças no intradomicílio (por exemplo, colchões, objetos

guardados, caixas, paredes, quadros presos nas paredes) e peridomicílio (por exemplo, galinheiros, pocilgas, galpões de gado, pilhas de telhas, madeira e tijolos) áreas que poderiam servir de abrigo natural para esses insetos. Dois operadores realizaram cada amostragem entre 8 e 12 horas por um período de 30 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em frascos de plástico e transportados para o laboratório para identificação morfológica (Lent e Wygodzinsky, 1979). Informações sobre as espécies dos vetores, estágio de vida, local de captura e município foram registradas.

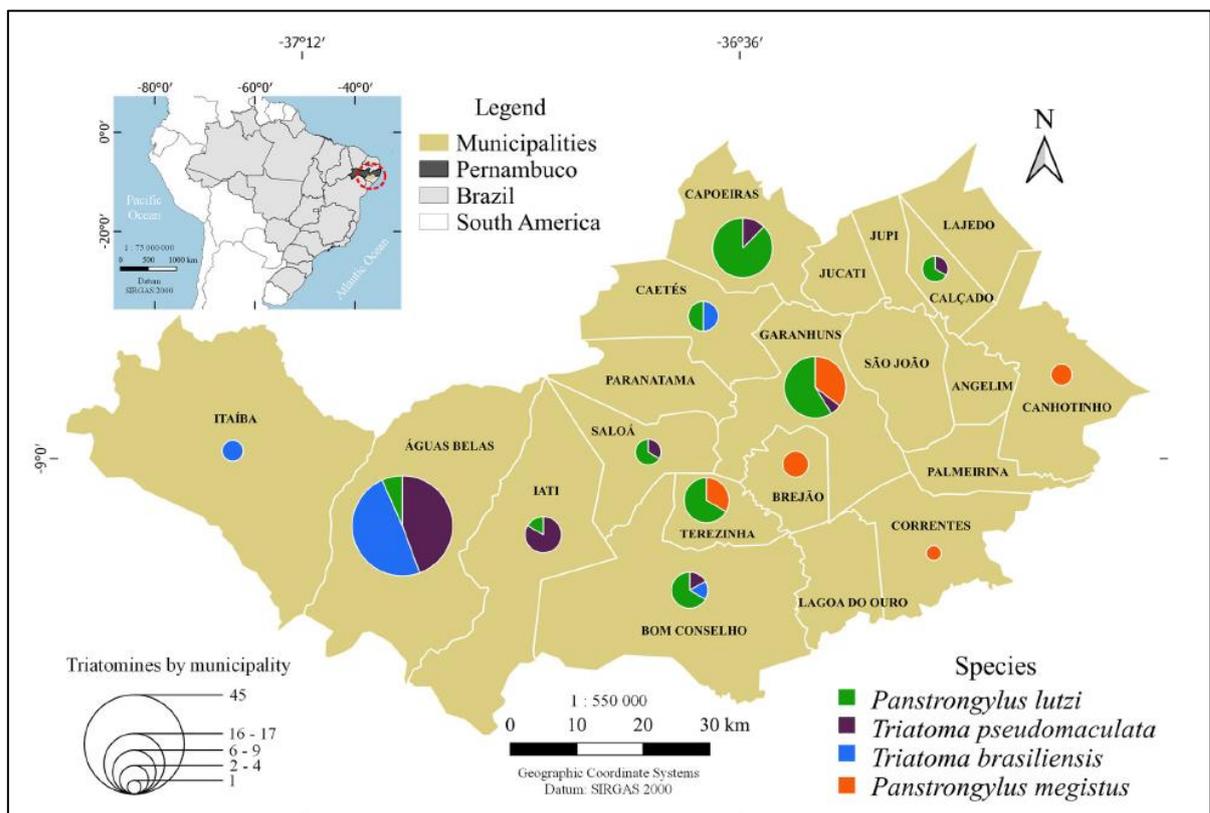


Fig. 1 Área de estudo e distribuição das espécies de triatomíneos coletadas na microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil.

Detecção da infecção por T. cruzi em triatomíneos

Exame microscópico

A detecção parasitológica direta foi realizada por compressão abdominal de cada inseto em 50µL de solução salina (0,9% NaCl), que foi então examinado em microscópico óptico com ampliação de 400× para investigar a presença de flagelados tripanosomatídeos.

Análise molecular

Os triatomíneos foram dissecados individualmente e separados para extração de DNA genômico, que foi realizado seguindo um protocolo previamente descrito (Ramos et al. 2015).

As amostras de DNA foram testadas individualmente para *Trypanosoma* spp. através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os iniciadores 18ST nF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA-3') e 18ST nR3 (5'-TGCGCGACCAATAATTGCAATAC-3'), que amplificam um produto de 700-800 pb do gene 18S rRNA (Geysen et al. 2003). Controles positivo (DNA de *T. cruzi* de um triatomíneo) e negativo (DNA de um triatomíneo não infectado) foram usados em todas as reações.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado sob um transiluminador UV. Os produtos amplificados foram purificados usando ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciado em ambas as direções em um sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Biosystems), usando o método Sanger (Sanger et al. 1977). As sequências de DNA foram comparadas com sequências do GenBank usando a ferramenta de pesquisa BLASTn (Altschul et al. 1990).

As amostras positivas para PCR foram ainda submetidas a uma multiplex PCR, com base no espaçador não transcrito do gene miniexon (Fernandes et al. 2001). Para isso, o conjunto de iniciadores TC1 (5'-ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG-3'), TC2 (5'-TTGCTCGCACACTCGGCTG-CAT-3') e TC3 (5'-CCGCGWACAACCCCTMATAAAAATG-3') da região intergênica do miniexon de *T. cruzi*

e um oligonucleotídeo comum a parte mais conservada do minixon do gene, Me (5'-TACCAATATAGTACAGAAACTG-3'). Esses primers amplificam produtos com 200 pb (TcI), 250 pb (TcII/TcV/TcVI) e 150 pb (TcIII/TcIV) (Fernandes et al. 2001; Aliaga et al. 2011). Controles positivo (DNA de *T. cruzi* de um triatomíneo) e negativos (DNA de um triatomíneo não infectado) foram utilizados em todas as reações, que também foram submetidas à eletroforese como descrito anteriormente, mas em gel de agarose a 3%.

Resultados

Dos 117 triatomíneos, 93,16% (109/117) foram coletados em áreas intradomiciliares e 6,84% (8/117) em áreas peridomiciliares. Todos os insetos foram classificados como adultos e identificados como *Panstrongylus lutzi* (37,60%; 44/117), *Triatoma pseudomaculata* (26,50%; 31/117), *Triatoma brasiliensis* (23,08%; 27/117) e *Panstrongylus megistus* (12,82%, 15/117) em 57,14% (12/21) dos municípios da área de estudo. A taxa de detecção parasitológica direta foi 9,40% (11/117). A taxa de infecção observada em triatomíneos foi de 13,33% (2/15) para *P. megistus*, 12,90% (4/31) para *T. pseudomaculata*, 7,41% (2/27) para *T. brasiliensis* e 6,82% (3/44) para *P. lutzi* (Neiva e Pinto 1923).

O trato digestivo de 91 espécimes (34 *P. lutzi*, 30 *T. pseudomaculata*, 15 *T. brasiliensis* e 12 *P. megistus*) foram analisados, molecularmente, porque em algumas amostras (n = 26) o material foi insuficiente para realizar tais análises. O exame microscópico detectou taxa global de infecção por *T. cruzi* de 5,49% (5/91), enquanto DNA de *Trypanosoma* spp. foi detectado em 26,37% (24/91) das amostras. Em particular, 26,47% (9/34) foram detectados em *P. lutzi*, 20,00% (6/30), em *T. pseudomaculata*, 13,33% (2/15), em *T. brasiliensis* e 58,33% (7/12) em *P. megistus*. Homologias variando de 96,5% a 99,8% foram detectadas com sequências de *T. cruzi* disponíveis no GenBank. A avaliação molecular revelou uma taxa de infecção por *T. cruzi*

de 12,09% (11/91), sendo 8,82% (3/34) em *P. lutzi*, 10,00% (3/30) em *T. pseudomaculata* e 41,67% (5/12) em *P. megistus*.

As sequências de DNA aqui obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso: MN721297, MN721298, MN721299, MN721300, MN721302, MN721303, MN721304, MN721305, MN721306, MN721308, MN721309. Vale ressaltar que a diferença entre o número de amostras positivas para PCR (24) e o número de sequências depositado no GenBank (11), foi devido à qualidade das sequências obtidas.

A tipagem molecular para o gene miniexon de *T. cruzi* foi realizada para 17 amostras, nas quais DNA de *Trypanosoma* spp. foi detectado. Doze amostras foram classificadas como TcI e as cinco restantes foram classificadas como DTU TcIII/TcIV (Tabela 1). Todas as amostras de TcI foram obtidas de triatomíneos capturados do ambiente intradomiciliar. A maioria das amostras que amplificaram para o primer TCIII (DTU TcIII/TcIV) eram triatomíneos do intradomicílio e apenas uma amostra do ambiente peridomiciliar.

Tabela 1 Triatomíneos examinados por espécie e infectados com diferentes DTUs de *Trypanosoma cruzi*.

| Espécies de triatomíneos | DTU TcI | | DTU TcIII/TcIV | |
|--------------------------|--------------------------------|--------|--------------------------------|--------|
| | Positivos/ Total examinados | FR (%) | Positivos/ Total examinados | FR (%) |
| <i>P. megistus</i> | 4/6 | 66,67 | 2/6 | 33,33 |
| <i>P. lutzi</i> | 2/5 | 40,00 | 3/5 | 60,00 |
| <i>T. pseudomaculata</i> | 5/5 | 100,00 | 0/5 | 0,00 |
| <i>T. brasiliensis</i> | 1/1 | 100,00 | 0/1 | 0,00 |
| Total | 12/17 | 70,59 | 5/17 | 29,41 |

DTU: *Discrete Typing Units*/ FR: Frequência relativa

Discussão

Este estudo revelou pela primeira vez a presença de DTUs de *T. cruzi* dos genótipos TcI e TcIII/TcIV em espécies de triatomíneos coletados em uma área endêmica para a doença de Chagas no Nordeste do Brasil (estado de Pernambuco), com predominância da cepa do genótipo TcI detectada, exclusivamente, em amostras coletadas no ambiente intradomiciliar. A genotipagem de *T. cruzi* baseada em um único alvo genético foi considerado uma limitação da pesquisa devido a potencial influência da troca genética (Zingales et al. 2012). Porém, os dados aqui apresentados são importantes e contribuem para o conhecimento epidemiológico dos genótipos de *T. cruzi* no Brasil.

Diferentes espécies de triatomíneos (*P. lutzi*, *T. pseudomaculata*, *T. brasiliensis* e *P. megistus*), a maioria deles capturados em áreas intradomiciliares, foram avaliados neste estudo. Esses dados são corroborados pelos resultados obtidos em uma pesquisa recente na região Nordeste do Brasil, que demonstraram que 94,5% dos espécimes de triatomíneos foram capturados em ambientes intradomiciliares (Silva et al. 2019). De modo geral, espécies de ambos os gêneros aqui detectados (*Panstrongylus* e *Triatoma*) são encontrados em cavidades de árvores, afloramentos rochosos e tocas de roedores (Gaunt e Milhas 2000). No entanto, podem procurar refúgio ou fontes de alimento em ambientes artificiais próximos a abrigos de animais, aumentando o risco de infecção (Ribeiro et al. 2014; Barbosa-Silva et al. 2019).

Em estudo anterior realizado na mesma área, *P. lutzi* também foi a espécie mais frequente (Silva et al. 2012). Este inseto tem um comportamento alimentar promíscuo usando animais sinantrópicos, bem como humanos como fontes de sangue (Silva et al. 2017). Além disso, apresenta alta taxa de infecção por *T. cruzi*, demonstrando sua importância em áreas endêmicas para DC (Silva et al. 2012). Por outro lado, *T. pseudomaculata* é encontrado predominantemente em troncos de árvores, e se alimentam principalmente de sangue de pássaros. Outra espécie importante aqui detectada, *T. brasiliensis*, tem sido considerado o

principal vetor de *T. cruzi* no Nordeste do Brasil. Embora esta espécie tenha sido predominantemente associada a roedores (por exemplo, *Galea spixii* e *Kerodon rupestris*) (Lilioso et al. 2020; Ferreira et al. 2020), ficou provado que eles podem usar uma ampla variedade de fontes alimentares de sangue (por exemplo, pássaro, gambá, cachorro, cabra e humano) (Silva et al. 2017). A área de estudo é uma importante produtora de leite no Brasil. Sendo assim, a expansão das áreas de criação bovina aumenta o desmatamento, que pode estar associado à redução dos habitats naturais dos vetores, resultando em uma intensa invasão de domicílios (Parente et al. 2017; Santos et al. 2020).

Os espécimes aqui analisados apresentaram taxas de infecção por *T. cruzi* de 5,49% e 12,09% ao exame microscópico e exames moleculares, respectivamente. Estudos microscópicos realizados em outras áreas endêmicas demonstraram menores taxas de infecção nos estados do Rio Grande do Norte (2,5%) (Barbosa-Silva, 2019), Ceará (1,4%) (Fidalgo et al. 2018) e Piauí (0,8%) (Gurgel-Gonçalves et al. 2010). Similarmente, uma investigação molecular realizada no estado da Bahia mostrou uma taxa de infecção de 10% (Ribeiro-Junior et al. 2019), também inferior ao observado no presente estudo. A maior taxa de infecção aqui detectada nas análises moleculares era um achado esperado, uma vez que a sensibilidade da PCR é muito alta quando comparada às técnicas microscópicas (Dworak et al. 2017). A análise microscópica não pode ser desconsiderada, pois é fundamental para diferenciar as fases de desenvolvimento do protozoário e, conseqüentemente, a taxa de metaciclogênese, que é uma característica importante relacionada à capacidade de dispersão do parasito. Assim, a combinação de análise microscópica e ferramentas moleculares é aconselhável para aumentar a precisão no diagnóstico e evitar resultados falsos negativos (Dworak et al. 2017; Herrera et al. 2021).

O genótipo TcI foi predominante em todas as espécies de triatomíneos aqui identificadas. Sabe-se que esta DTU é frequentemente encontrada nesses invertebrados (Brenière et al. 2016), sendo altamente prevalente em ambientes antrópicos (Lima-Oliveira et al. 2020). No

Brasil, TcI foi isolado de *P. megistus* (Ribeiro et al. 2016), *Triatoma petrochiae* Pinto e Barreto, 1925 (Lima-Oliveira et al. 2020), *T. brasiliensis* (Bezerra et al. 2018; Costa et al. 2018; Lilio et al. 2017; Lima-Oliveira et al. 2020), *Triatoma viticeps* (Stål, 1859) (Dario et al. 2018), *Triatoma sordida* (Cominetti et al. 2014), *T. pseudomaculata*, *Rhodnius nasutus* (Brito et al. 2008) e *Rhodnius pictipes* (Xavier et al. 2014).

Embora detectado apenas em infecções únicas neste estudo, este genótipo foi encontrado em infecções mistas com TcIV em espécies de triatomíneos coletadas nos Estados Unidos, sugerindo que os vetores se alimentem de sangue de diferentes hospedeiros, ou de um único hospedeiro vertebrado co-infectado com DTUs distintas (Curtis-Robles et al. 2018). No Brasil, co-infecções por TcI foram relatadas em *T. brasiliensis* (TcI, TcII/VI e TcI e *Trypanosoma rangeli* genótipo A) (Lima-Oliveira et al. 2020); em amostras de açaí (TcI, TcIII, TcV, TcVI) (Ferreira et al. 2018) e tecido cardíaco de um caso fatal de doença de Chagas (TcI, TcII, TcIII, TcIV e *Trypanosoma dionisii*) (Dario et al. 2016). Em condições experimentais, TcI apresentou a maior taxa de infecção em macrófagos, seguido por TcII e TcIII (Ribeiro et al. 2018). Isso demonstra a complexidade da patogênese da DC e a influência da heterogeneidade de diferentes cepas de *T. cruzi* na fisiopatologia da doença (Ribeiro et al. 2018). Além disso, TcI foi isolado em humanos apresentando diferentes evoluções clínicas da doença de Chagas (ou seja, assintomática, cardiomiopatia grave, e em infecções agudas crônicas e fatais) (Abolis et al. 2011; Ramírez et al. 2010; Santana et al. 2014; Oliveira et al. 2017; Calvopina et al. 2020).

Cinco amostras de espécimes de *Panstrongylus* spp. amplificaram para o primer TCIII, que é específico para DTUs (TcIII e TcIV), relacionados ao ciclo silvestre (Zingales 2018). TcIII já foi isolado de *P. lutzii* e de humano infectado no Brasil (Abolis et al. 2011). Apesar de ser predominante no ciclo silvestre, o TcIV já foi isolado em triatomíneos do ciclo doméstico e humanos na Venezuela (Carrasco et al. 2012) e no Brasil (Monteiro et al. 2012).

No geral, a diversidade genética de *T. cruzi* é subestimada (Jansen et al. 2020) e a real importância deste conhecimento tem sido negligenciado em regiões endêmicas das Américas. De fato, a caracterização molecular dessas cepas é fundamental para entender melhor a eco-epidemiologia da infecção (Brenière et al. 2016). Essa abordagem fornece informações importantes sobre interações parasito-hospedeiro (Ribeiro et al. 2018). No entanto, a associação dessas DTUs com hospedeiros vertebrados e diferentes ciclos biológicos deve ser interpretada com cuidado (Jansen et al. 2020), uma vez que não foi possível associar os genótipos de *T. cruzi* a qualquer variável de resposta biológica (bioma e ambiente) ou espécies hospedeiras (Jansen et al. 2020).

No estado de Pernambuco, Brasil, em estudo anterior, amostras de sangue de pacientes com DC crônica apresentaram TcII e TcVI (Rodrigues-dos-Santos et al. 2018), no entanto, até onde sabemos, esta é a primeira análise molecular de infecções e genotipagem de *T. cruzi* em triatomíneos na área estudada, demonstrando uma maior taxa de infecção em comparação com a técnica microscópica, comumente usada pelo Programa Nacional de Controle da doença de Chagas (PNCDCCh). A detecção de vetores positivos dentro ou perto de habitações humanas sugere que as pessoas que vivem nesta área endêmica para a doença de Chagas têm riscos potenciais de serem infectadas por *T. cruzi*. Além disso, é um alerta para a necessidade de implementação de medidas preventivas como a vigilância entomológica, para reduzir o risco de infecções humanas e animais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Adeji Maria do Carmo e Jeane Cristina O. L. Silva do Laboratório de Endemias (V Gerência Regional de Saúde) pela assistência no exame microscópico direto. Este artigo é baseado na tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biociência

Animal) da primeira autora, desenvolvido na Universidade Federal Rural de Pernambuco, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Abolis, N.G., Araújo, S.M., Toledo, M.J.O., Fernandez, M.A., Gomes, M.L., 2011. *Trypanosoma cruzi* I–III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.* 120, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.001>.
- Aliaga, C., Brenière, S.F., Barnabé, C., 2011. Further interest of minixon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infec. Gen. Evol.* 11, 1155–1158. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.013>.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Barbosa-Silva, A.N., Câmara, A.C.J. da, Martins, K., Nunes, D.F., Oliveira, P.I.C. de, Azevedo, P.R.M. de, Chiari, E., Galvão, L.M.C., 2016. Characteristics of triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 57–67. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0300-2015>.
- Barbosa-Silva, A.N., Souza, R.C.M., Diotauti, L., Aguiar, L.M.A., Câmara, A.C.J., Galvão, L.M.C., Chiari, E., 2019. Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, 1–8. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0061-2019>.

- Bezerra, C.M., Barbosa, S.E., Souza, R., Barezani, C.P., Gürtler, R.E., Ramos, A.N., Jr, Diotaiuti, L., 2018. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. *Parasit. Vectors.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3235-4>.
- Bezerra, C.M., Cavalcanti, L.P., Souza, R., Barbosa, S.E., Xavier, S.C., Jansen, A.M., Ramalho, R. D., Diotaiuti, L., 2014. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 109, 887–898. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140048>.
- Brenière, S.F., Waleckx, E., Barnabé, C., 2016. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Neg. Trop. Dis.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>.
- Brito C.M.M, Lima, M.M., Sarquis, O., Pires, M.Q., Coutinho, C.F.S., Duarte, R., Pacheco, R.S., 2008. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 103, 1111–1117. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1102-5>.
- Calvopina, M., Segovia, G., Cevallos, W., Vicuña, Y., Costales, J.A., Guevara, A., 2020. Fatal acute Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* DTU TcI, Ecuador. *BMC Infect. Dis.* 20, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4851-0>.
- Carrasco, H.J., Segovia, M., Llewellyn, M.S., Morocoima, A., Urdaneta-Morales, S., Martínez, C., Martínez, C.E., Garcia, C., Rodríguez, M., Espinosa, R., de Noya, B.A., Díaz-Bello, Z., Herrera, L., Fitzpatrick, S., Yeo, M., Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., 2012. Geographical

distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. PLoS Neg. Trop. Dis. 6, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001707>.

Cominetti, M.C., Csordas, B.G., Cunha, R.C., Andreotti, R., 2014. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 47, 747–755. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0234-2014>.

Costa, A.P. da, Ferreira, J.I.G.S., Silva, R.E. da, Tonhosolo, R., Araújo, A.C., Guimarães, M.F., Horta, M.C., Labruna, M.B., Marcili, A., 2018. *Trypanosoma cruzi* in triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões, Northeastern Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 51, 445–451. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0098-2018>.

Curtis-Robles, R., Auckland, L.D., Snowden, K.F., Hamer, G.L., Hamer, S.A., 2018. Analysis of over 1500 triatomine vectors from across the US, predominantly Texas, for *Trypanosoma cruzi* infection and Discrete Typing Units. Infect. Gen. Evol. 58, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.016>.

Dario, M.A., Andrade, T., Dos Santos, C.B., Fux, B., Brandão, A.A., Falqueto, A., 2018. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* samples derived from *Triatoma vitticeps* and *Panstrongylus geniculatus* of the Atlantic rainforest, southeast Brazil. Parasite. 25, 1–9. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018060>.

Dworak, E.S., Araújo, S.M. de, Gomes, M.L., Massago, M., Ferreira, É.C., Toledo, M.J.O., 2017. Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 50, 629–637. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0219-2017>.

Fernandes, O., Santos, S.S., Cupoulo, E., Mendonga, B., Derre, R., Junqueira, A.C.V., Santos, L.C., Sturm, N.R., Naif, R.D., Barreto, T.V., Campbell, D.A., Coura, J.R., 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma*

cruzi and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 97–99. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90350-5](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90350-5).

Fidalgo, A.S.O.B.V., Costa, A.C. da, Silva Filho, J.D. da, Cândido, D.S., Freitas, E.C., Pereira, L.S., Andrade, M.C. de, Gomes, K.C.M.S., Bezerra, C.M., Oliveira, M.F., 2018. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51, 174–182. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0408-2017>.

Gaunt, M., Miles, M., 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95, 557–565. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400019>.

Geysen, D., Delespaux, V., Geerts, S., 2003. PCR–RFLP using *Ssu*-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet. Parasitol.* 110, 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00313-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00313-8).

Gurgel-Gonçalves, R., Pereira, F.C.A., Lima, I.P., Cavalcante, R.R., 2010. Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) no Estado do Piauí, Brasil, 2008. *Rev. Pan-Amaz. Saude.* 1, 57–64. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000400009>.

Jansen, A.M., Xavier, S., Roque, A., 2020. Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Front. Cel. Infec. Microbiol.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00010>.

Jansen, A.M., Xavier, S.C.C., Roque, A.L.R., 2018. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit. Vectors.* 11, 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>.

- Jansen, A.M., Xavier, S.C.C., Roque, A.L.R., 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 151, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018>.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bul. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 127–520.
- Lilioso, M., Folly-Ramos, E., Rocha, F.L., Rabinovich, J., Capdevielle-Dulac, C., Harry, M., Marcet, P.L., Costa, J., Almeida, C.E., 2017. 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?. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 1456–1459. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0823>
- Lima-Oliveira, T.M., Fontes, F.V.H.M., Lilioso, M., Pires-Silva, D. Teixeira, M.M.G., Meza, J.G.V., Harry, M., Fileé, J., Costa, J. Valença-Barbosa, C., Folly-Ramos, E., Almeida, C.E., 2020. Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrocchiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. *Acta Trop.* 201, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105188>.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A., Veludo, H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V.L.B., Teixeira, M.M.G., 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitol.* 136, 641–655. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>.
- Marcili, A., Valente, V., Valente, A., Junqueira, A.C.V., Maia da Silva, F., Naiff, R., Campaner, M., Coura, J. R., Camargo, E. P., Miles, M. A., Teixeira, M.M.G., 2009. *Trypanosoma*

cruzi in Brazilian Amazonia: lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.015>.

Martins, K., Andrade, C.M., Barbosa-Silva, A. N., Nascimento, G.B., Chiari, E., Galvão, L.M.C., Câmara, A.C.J., 2015. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 39, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.012>.

Monteiro, W.M., Magalhães, L.K., de Sá, A.R., Gomes, M.L., Toledo, M.J., Borges, L., Pires, I., Guerra, J.A., Silveira, H., Barbosa, M.G.V., 2012. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PloS One.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041284>.

Oliveira, T.S.F. de, Santos, B.N. dos, Galdino, T.S., Hasslocher-Moreno, A.M., Bastos, O.M.P., Sousa, M.A. de., 2017. *Trypanosoma cruzi* I genotype among isolates from patients with chronic Chagas disease followed at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (FIOCRUZ, Brazil). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 35–43. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0406-2016>.

Ramírez, J.D., Guhl, F., Rendón, L.M., Rosas, F., Marin-Neto, J.A., Morillo, C.A., 2010. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Neg. Trop. Dis.* 4, 1–9.

Ramírez, J.D., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A.C., Parra, E., Cucunubá, Z.M., 2014. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to Tcbat genotype. *Zoon. Pub. Health.* 61, 477–479. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000899>.

- Ramos, R.A.N., Campbell, B.E., Whittle, A., Lia, R.P., Montarsi, F., Parisi, A., Dantas-Torres, F., Wall, R., Otranto, D., 2015. Occurrence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Southern Italy. *Ticks Tick-borne Dis.* 6, 234–236. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.001>.
- Ribeiro, A.R., Lima, L., de Almeida, L.A., Monteiro, J., Moreno, C., Nascimento, J.D., de Araújo, R.F., Mello, F., Martins, L., Graminha, M., Teixeira, M., Silva, M.S., Steindel, M., da Rosa, J.A., 2018. Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 453–463. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0200>.
- Ribeiro, A.R., Mendonça, V.J., Alves, R.T., Martinez, I., Araújo, R.F. de, Mello, F., Rosa, J.A. da., 2014. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Saude Pub.* 48, 295–302. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004719>
- Ribeiro, A.R., Oliveira, R.C. de, Ceretti Junior, W., Lima, L., Almeida, L.A. de, Nascimento, J.D., Teixeira, M.M.G., Rosa, J.A. da., 2016. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 183–189. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0366-2015>.
- Ribeiro-Júnior, G., Dos Santos, C., Lanza, F., Reis, J., Vaccarezza, F., Diniz, C., Miranda, D., de Araújo, R.F., Cunha, G.M., de Carvalho, C., Fonseca, E., Dos Santos, R.F., de Sousa, O., Reis, R.B., de Araújo, W N., Gurgel-Gonçalves, R., Dos Reis, M.G., 2019. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasit. Vectors.* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3849-1>.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Santana, R.A., Magalhães, L.K., Magalhães, L.K., Prestes, S.R., Maciel, M.G., da Silva, G.A., Monteiro, W.M., de Brito, F.R., Coelho, L.I.A.R.C, Barbosa-Ferreira, J.M., Guerra, J. A., Silveira, H., Barbosa, M.G.V., 2014. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit. Vectors.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-267>.
- Silva, M.B.A., Menezes, K.R. de, Farias, M.C.G. de, Andrade, M.S., Victor, C.C.A., Lorosa, E.S., Jurberg, J., 2017. Description of the feeding preferences of triatominae in the Chagas disease surveillance study for the State of Pernambuco, Brazil (Hemiptera: Reduviidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 543–546. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0334-2016>.
- Silva, T.R.M., Barros, G.M.M.R., Lima, T.A.R.F., Giannelli, A., Silva, G.M.da, Alves, K.M.L., Carvalho, G.A. de, Ramos, R.A.N., 2019. Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, 1–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0278-2019>.
- WHO – World Health Organization, 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> (accessed 15 December 2019).
- Xavier, S.C., Roque, A.L., Bilac, D., de Araújo, V.A., da Costa Neto, S.F., Lorosa, E.S., da Silva, L.F., Jansen, A.M., 2014. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Neg. Trop. Dis.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002878>.

- Zingales, B., 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm, N.R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infec. Gen. Evol.* 12, 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.

CAPÍTULO 3

Infections by trypanosomatid (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in triatomines (Hemiptera: Triatominae): a spatiotemporal assessment in an endemic area for Chagas Disease

(Anexo 3: artigo publicado no periódico, *Zoonoses and Public Health*, v. 69, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12898>)

**Infecções por tripanosomatídeos (Kinetoplastida:
Trypanosomatidae) em triatomíneos (Hemiptera: Triatominae):
Uma avaliação espaço-temporal em uma área endêmica
para doença de Chagas**

Resumo

Esta pesquisa analisou a distribuição espaço-temporal de triatomíneos infectados por parasitos tripanosomatídeos em uma região endêmica para a doença de Chagas (DC), no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. A base de dados incluiu o número total de triatomíneos capturados nas áreas intradomiciliares e peridomiciliares, bem como a taxa de infecção (TI) por tripanosomatídeos. O método G_i^* por Getis–Ord foi usado para identificar agrupamentos de concentração estatisticamente significativos e a TI de triatomíneos por tripanosomatídeos. Foi utilizado um modelo de regressão linear generalizado com distribuição binomial para avaliar a probabilidade de detectar a taxa de infecção por tripanosomatídeos. Ao todo, 4.800 triatomíneos foram examinados, formas flagelares semelhantes a *Trypanosoma cruzi* foram detectadas em 10,29% deles, e a maioria das amostras positivas (98,17%) foram coletadas no intradomicílio. As análises geoespaciais identificaram aglomerados de triatomíneos em ambientes intradomiciliares e peridomiciliares. De acordo com a regressão logística para as espécies (*Panstrongylus lutzi*, *P. megistus*, *Triatoma brasiliensis* e *T. pseudomaculata*), a probabilidade de detecção da infecção por *T. cruzi* permanece constante em até 50 espécimes examinados ou mais. Os achados desta pesquisa revelaram um cenário nunca estudado nesta área através deste tipo de análise espaço-temporal, que é essencial para identificar áreas de vulnerabilidade para a ocorrência desses vetores e consequentemente para a doença de Chagas.

Palavras-chave: distribuição, taxa de infecção, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*.

Impactos

- A distribuição espaço-temporal dos triatomíneos foi avaliada.
- *Trypanosoma cruzi* foi detectado em 10,29% dos triatomíneos examinados.
- Os dados permitem a identificação de áreas de vulnerabilidade para ocorrência de vetores.

1 Introdução

Os triatomíneos (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae) são insetos hematófagos de grande importância médica que atuam como vetores de patógenos, incluindo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida:Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas (DC) (Lent & Wygodzinsky, 1979). Esta antropozoonose negligenciada é endêmica em muitas áreas da América Latina, onde permanece como uma importante causa de morbimortalidade em populações humanas (Machado et al., 2012).

No Brasil, é considerada a segunda mais importante causa de mortalidade por infecções parasitárias, com aproximadamente 55.200 óbitos de 2008 a 2019 (Brasil, 2019a). Infelizmente, não existe vacina, e a cura depende de fatores como o estágio da doença, a idade do paciente e a suscetibilidade as cepas de *T. cruzi* às drogas antiparasitárias. Assim, a vigilância vetorial é uma importante estratégia para prevenir a infecção humana (Dias et al., 2016; Ribeiro-Júnior et al., 2019).

Os vetores ocorrem predominantemente em regiões neotropicais (Jurberg et al., 2017), habitando, especialmente, ambientes silvestres (Cominetti et al., 2014). No entanto, mudanças ecológicas recentes (por exemplo, desmatamento, mudanças climáticas e urbanização) nas áreas rurais e urbanas têm alterado o comportamento desses insetos, que têm sido frequentemente observados próximo de habitações humanas (ambientes intradomiciliares ou peridomiciliares) (Argolo et al., 2008; Fidalgo et al., 2018; Sarquis et al., 2012; Schmuñis,

2000). Embora todas as espécies da subfamília Triatominae sejam considerados potenciais vetores de *T. cruzi*, apenas alguns deles reúnem condições específicas para ser um bom vetor, como um alto grau de colonização de ecótopos artificiais, comportamento antropofílico e um intervalo curto entre a refeição e a defecação (Galvão, 2014).

No Brasil, foram registradas 68 espécies de triatomíneos e 13 foram considerados de importância epidemiológica (*Panstrongylus geniculatus* [Latreille, 1811], *P. lutzi* [Neiva & Pinto, 1923], *P. megistus* [Burmeister, 1835], *Rhodnius nasutus* [Stål, 1859], *R. neglectus* [Quaresma, 1954], *R. robustus* [Larrousse, 1927], *Triatoma maculata* [Erichson, 1848], *T. pseudomaculata* [Corrêa & Espínola, 1964], *T. infestans* [Klug, 1834], *T. rubrovaria* [Blanchard, 1843], *T. brasiliensis* [Neiva, 1911], *T. sordida* [Stål, 1859] e *T. vitticeps* [Stål, 1859]; Brasil, 2019b). Por muito tempo, a principal medida de controle da DC foi baseada na vigilância vetorial, e após um extenso programa de controle, o Brasil foi certificado como área livre de transmissão de *T. cruzi* por *T. infestans*. No entanto, outras espécies de triatomíneos continuam a invadir e colonizar ambientes artificiais perpetuando a doença em regiões endêmicas (Abad-Franch et al., 2013). A disseminação de áreas habitadas por humanos pode perturbar locais onde ocorrem ciclos naturais de *T. cruzi*, levando triatomíneos a invadir domicílios e também manter reservatórios sinantrópicos próximos de moradias humanas (Coura, 2007). Com o tempo, essas alterações permitiram a disseminação de triatomíneos infestando o intra e o peridomicílio, com taxas de infecção (TI) por *T. cruzi* variando de 1,3% (Fidalgo et al., 2018) a 19,6% em algumas regiões (Dias et al., 2016).

O monitoramento da dinâmica de populações de vetores capazes de transmitir *T. cruzi* a hospedeiros suscetíveis é fundamental para conhecer melhor as potenciais áreas de risco, onde há a proximidade desses vetores a habitações humanas (Barbosa-Silva et al., 2019). Mais recentemente, vários modelos estatísticos têm sido usados para analisar o comportamento espaço-temporal dos vetores e seus patógenos, gerando dados essenciais para a aplicação de

medidas preventivas contra doenças negligenciadas (Talla et al., 2014). Portanto, este estudo objetivou analisar a distribuição espaço-temporal de triatomíneos e avaliar a probabilidade de detecção da TI por tripanosomatídeos nesses vetores.

2 Materiais e métodos

2.1 Área de estudo, coleta de dados e aspecto ético

A área de estudo está localizada na região Nordeste do Brasil, abrangendo um total de 21 municípios pertencentes à região de saúde de Garanhuns (Latitude 8°53'27"S e Longitude 36°29'48"O), estado de Pernambuco (Figura S1). Esses municípios são caracterizados por um clima semi-árido com temperatura média anual de 22°C (variando de 17°C a 30°C), precipitação média de 147 mm (variando de 25 a 295 mm) e umidade relativa do ar de 90%. Esta área é uma região endêmica para DC, onde espécies de triatomíneos foram capturadas em ambientes intradomiciliares e peridomiciliares (Silva et al., 2019). Além disso, de 2001 a 2017, foram registrados 68 óbitos por DC na mesma área (Brasil, 2019b).

Um estudo retrospectivo foi realizado usando os dados de 2008 a 2018, produzido pelo Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas (PNCDCh) e fornecido pela V Gerência Regional de Saúde do estado de Pernambuco. É importante notar que a coleta de espécimes não seguiu uma frequência regular.

Resumidamente, os espécimes de triatomíneos foram coletados manualmente com o auxílio de pinças no intradomicílio (por exemplo, colchões, objetos guardados, caixas, quadros colados nas paredes) e peridomicílio (ex. galinheiros, pocilgas, galpões para gado, pilhas de telhas, madeira e tijolos). Cada amostragem foi realizada entre 8 e 12 horas por dois operadores por um período de 30 min tanto em ambientes peridomiciliares como intradomiciliares. Após a coleta, os espécimes foram individualmente avaliados por meio de compressão abdominal e exame do material fecal. O conteúdo fecal foi homogeneizado em 50 µl de solução salina (0,9%

NaCl) e visualizado sob um microscópio óptico em diferentes ampliações (100× e 400×). A lâmina inteira foi observada em cada análise. Por fim, a identificação das espécies de triatomíneos foi realizada de acordo com Lent e Wygodzinsky (1979).

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco aprovou todos os procedimentos aqui realizados (número da aprovação 12/2019).

2.2 Análise de dados

A correção de Yates teste qui-quadrado (χ^2) foi usado para comparar a presença de triatomíneos positivos em áreas intradomiciliares ou peridomiciliares. O Kruskal-Wallis teste foi usado para comparar os triatomíneos coletadas nos diversos municípios. O nível de significância foi fixado em 5%. O software BioEstat (v. 5.3) foi usado para realizar as análises estatísticas.

2.3 Modelos estatísticos

O método G_i^* por Getis-Ord foi usado para identificar agrupamentos estatisticamente significativos de valores altos (pontos quentes) e valores baixos (pontos frios) (Getis-Ord, 1992; Fischer & Getis, 2009; Pfeiffer et al., 2008) de concentrações de triatomíneos em ambientes intradomiciliares e peridomiciliares, e também para a TI de triatomíneos positivos para *T. cruzi* em cada município. Os dados foram agrupados a cada dois anos, com exceção do ano (2018), para facilitar sua interpretação. O G_i^* é calculado da seguinte forma:

$$G_i^* = \frac{\sum_{j=1}^n w_{i,j} x_j - \bar{X}_i \sum_{j=1}^n w_{i,j}}{S_i \sqrt{\frac{[n \sum_{j=1}^n w_{i,j}^2 - (\sum_{j=1}^n w_{i,j})^2]}{n-1}}}, \quad \forall j \neq i$$

onde x_j é o valor do atributo para o recurso j (por exemplo, total de triatomíneos examinados das áreas intradomiciliar e peridomiciliar e TI em cada município), $w_{i,j}$ é a matriz de peso espacial entre o atributo i e j , n é igual ao número total de recursos e:

$$\bar{X}_i = \frac{\sum_{j,j \neq i}^n x_j}{n}$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{j,j \neq i}^n x_j^2}{n} - (\bar{X}_i)^2}$$

onde \bar{X}_i é a média e S_i é o desvio padrão dos valores dos atributos no período analisado para o recurso i , respectivamente. Essa estatística cria um z-score, que denota a significância de uma área específica sobre suas áreas vizinhas. Figuras foram criadas usando saídas do método G_i^* , uma para o número total de triatomíneos examinados nas áreas intradomiciliar e peridomiciliar e outra para a TI de triatomíneos infectados por *T. cruzi*.

Um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial (modelo de regressão logística) (Dohoo et al., 2003; Thrusfield et al., 2018) foi usado para avaliar a probabilidade de detectar a TI por *T. cruzi* em triatomíneos, de acordo com o número examinado.

$$Y_i = \text{Binomial}(p_i, n_i)$$

onde n_i representa o número de tentativas (Knowles) e p_i é a probabilidade dos eventos. O modelo de regressão logística foi adicionado como variável resposta a TI (r_i , $i = 0, \dots, 1$), como variáveis explicativas o número de triatomíneos avaliados (x_{1_i} , $i = 1, \dots, 150$), e as espécies de triatomíneos (*P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*) identificadas na região de estudo (x_{2_i} , $i = 1, \dots, 4$). A equação é representada da seguinte forma:

$$\log \left(\frac{P(r_i = 1)}{1 - P(r_i = 1)} \right) = \beta_0 + \beta_{1_i} x_{1_i} + \beta_{2_i} x_{2_i} + \varepsilon_i,$$

onde β_0 , β_{1_i} e β_{2_i} são os parâmetros a serem estimados, os coeficientes linear e angular, respectivamente; e ε_i é o erro aleatório. O teste de Wald (Bewick et al., 2005; Perdue & Seal, 2000) foi aplicado para avaliar a diferença significativa que existe entre as espécies de triatomíneos ($\alpha \leq 0.05$). Além disso, um gráfico foi construído a partir da regressão logística, mostrando a probabilidade média de encontrar uma determinada TI para *P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* em relação ao número de triatomíneos avaliados.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R-3.6.1 ("R Core Team", 2019), com os seguintes pacotes: Tidyverse (Wickham, 2017), sf (Pebesma, 2018), spdep (Bivand & Wong, 2018), Estatísticas ("R Core Team", 2019) e aod (Lesnoff & Lancelot, 2012).

3 Resultados

No total, 4.800 triatomíneos foram coletados e examinados, as formas sugestivas de tripanosomatídeos de *T. cruzi* foram detectadas em 10,29% (494/4.800). De todos os insetos positivos, 98,17% (485/494) foram coletados em áreas intradomiciliares enquanto 1,83% (9/494) em áreas peridomiciliares ($\chi^2 = 456,731$; $p < 0,0001$). Tripanosomatídeos semelhantes a *T. cruzi* foram detectados em triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus* (Berg, 1879) e *Triatoma* (Laporte, 1832) (Tabela 1). Dados brutos de número de espécimes coletados em cada município nas áreas de intradomicílio e peridomicílio estão disponíveis na Tabela S1.

Tabela 1. Triatomíneos examinados e taxa de infecção por formas de tripanosomatídeos em áreas de intra e peridomicílio, durante todo o período do estudo (2008-2018).

| Espécies | Área intradomiciliar | | | Área peridomiciliar | | | Total | | |
|------------------------------|----------------------|------------|--------------|---------------------|-----------|-------------|-------------|------------|--------------|
| | Examinados | Positivos | TI (%) | Examinados | Positivos | TI (%) | Examinados | Positivos | TI (%) |
| <i>T. rubrovaria</i> | 1 | 1 | 100,00 | 0 | 0 | 0,00 | 1 | 1 | 100,00 |
| <i>P. megistus</i> | 884 | 128 | 14,48 | 82 | 2 | 2,44 | 966 | 130 | 13,46 |
| <i>T. melanocephala</i> | 8 | 1 | 12,50 | 0 | 0 | 0,00 | 8 | 1 | 12,50 |
| <i>T. pseudomaculata</i> | 993 | 105 | 10,57 | 71 | 3 | 4,23 | 1064 | 108 | 10,15 |
| <i>P. lutzi</i> | 1461 | 149 | 10,20 | 36 | 0 | 0,00 | 1497 | 149 | 9,95 |
| <i>Triatoma spp.</i> | 11 | 1 | 9,09 | 0 | 0 | 0,00 | 11 | 1 | 9,09 |
| <i>Triatoma brasiliensis</i> | 1183 | 100 | 8,45 | 64 | 4 | 6,25 | 1247 | 104 | 8,34 |
| <i>T. infestans</i> | 0 | 0 | 0,00 | 1 | 0 | 0,00 | 1 | 0 | 0,00 |
| <i>Panstrongylus sp.</i> | 0 | 0 | 0,00 | 1 | 0 | 0,00 | 1 | 0 | 0,00 |
| <i>Rhodnius spp.</i> | 4 | 0 | 0,00 | 0 | 0 | 0,00 | 4 | 0 | 0,00 |
| Total | 4545 | 485 | 10,67 | 255 | 9 | 3,53 | 4800 | 494 | 10,29 |

Abreviação: TI, taxa de infecção.

3.1 Análise de dados

A base de dados incluiu triatomíneos positivos no intradomicílio e peridomicílio de cada município. A identificação de tripanosomatídeos foi determinada usando características morfológicas anteriormente descritas (Souza, 1999). Resumidamente, eles foram caracterizados pela presença de flagelo, membrana ondulante e o cinetoplasto localizado próximo ao núcleo. Triatomíneos positivos para *T. cruzi* foram detectados em 90,48% (19/21) dos municípios estudados. No geral, Águas Belas e Iati apresentaram o maior número de espécimes positivos coletados nas áreas intradomiciliar e peridomiciliar. Não foi observada diferença estatística entre as duas áreas citadas anteriormente ($p > 0,05$), mas diferem estatisticamente de todos os outros municípios ($p < 0,05$). A TI foi maior nos municípios de Jupi e Calçado (Tabela S2).

As espécies de triatomíneos mais frequentemente infectadas incluíram *P. megistus*, *T. pseudomaculata*, *P. lutzi* e *T. brasiliensis*. A Figura 1 ilustra o número de triatomíneos capturados e examinados por ano para as quatro espécies (*P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*) que foram estatisticamente significativas. Durante todo o período de estudo (2008-2018), uma aparente redução gradual no número de insetos coletados e TI foram observados (Figura 1).

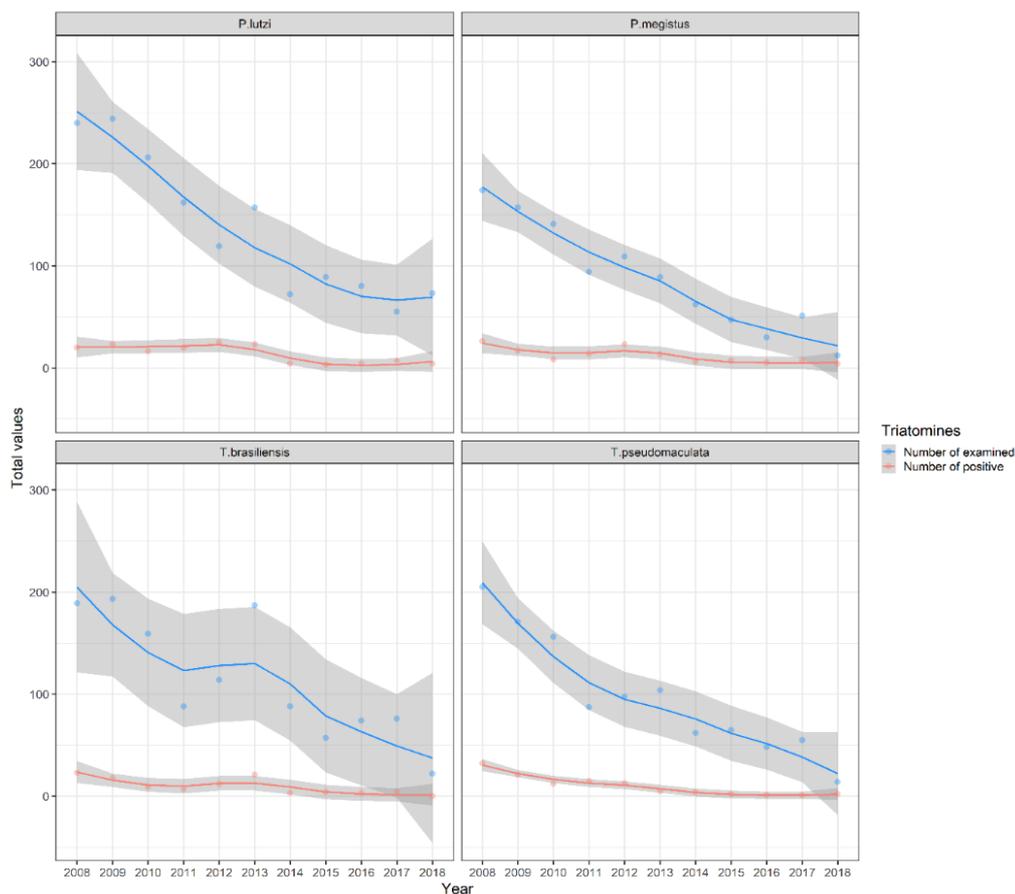


Figura 1 Número de triatomíneos examinados e capturados por ano (2008–2018). Os pontos representam os valores observados por ano (total de triatomíneos examinados e positivos). Os dados foram divididos em quatro janelas, uma para cada espécie analisada (*Panstrongylus lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*). O intervalo de confiança (95%) (em cinza) também é mostrado para o total de triatomíneos examinados e positivos.

3.2 Análise geoestatística

As análises geoespaciais permitiram a identificação de pontos quentes e frios para triatomíneos examinados de áreas intradomiciliares em seis períodos (2008–2009 até 2018). Em particular, na área intradomiciliar foram identificados pontos quentes em Águas Belas e pontos frios identificados em Garanhuns durante todo o estudo (de 2008 a 2018). A Figura 2

ilustra pontos quentes e frios para triatomíneos examinados no intradomicílio para todos os municípios durante todo o período de estudo.

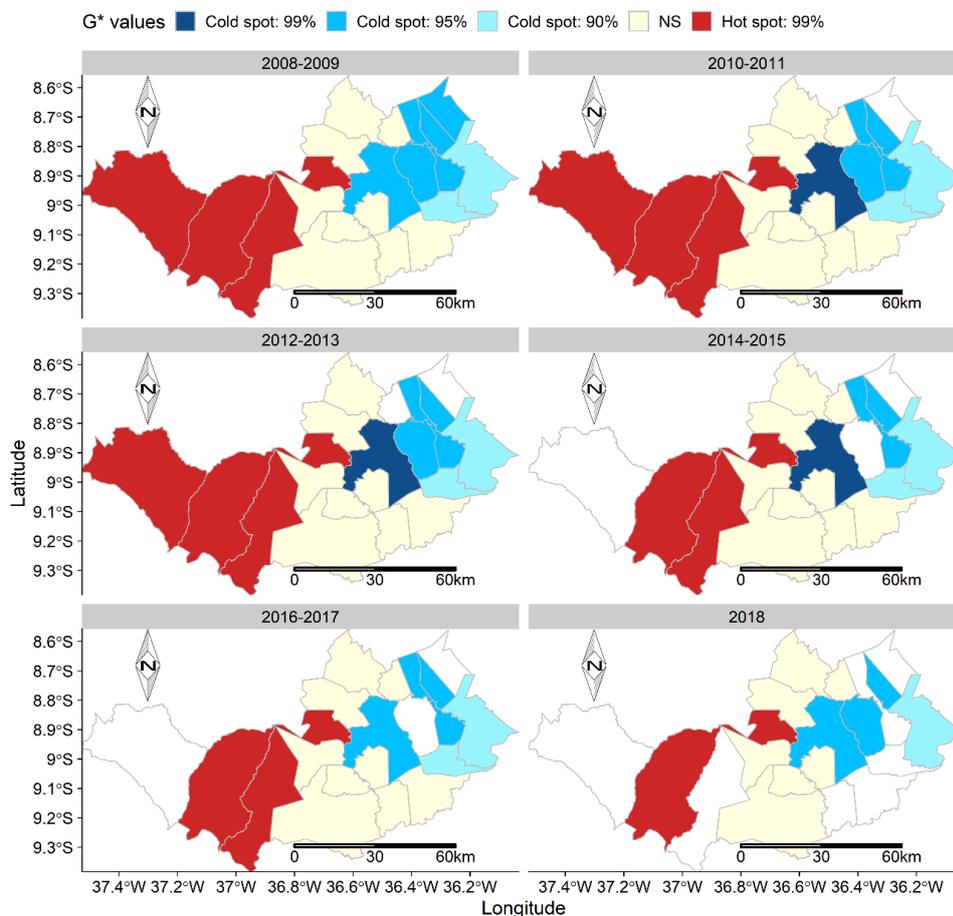


Figura 2 Pontos quentes e frios para triatomíneos examinados nas áreas intradomiciliares de cada município. As áreas em branco correspondem a municípios dos quais não havia dados.

Para triatomíneos examinados em áreas de peridomicílio, os pontos quentes foram identificados em Águas Belas durante 2008–2009, 2010–2011, 2014–2015 e 2016–2017 e em Itaíba durante 2008–2011. Por outro lado, pontos frios foram identificados em Garanhuns de 2008–2009 até 2016–2017. A Figura 3 ilustra pontos quentes e frios para triatomíneos examinados nas áreas de peridomicílio para todos os municípios durante todo o período de estudo.

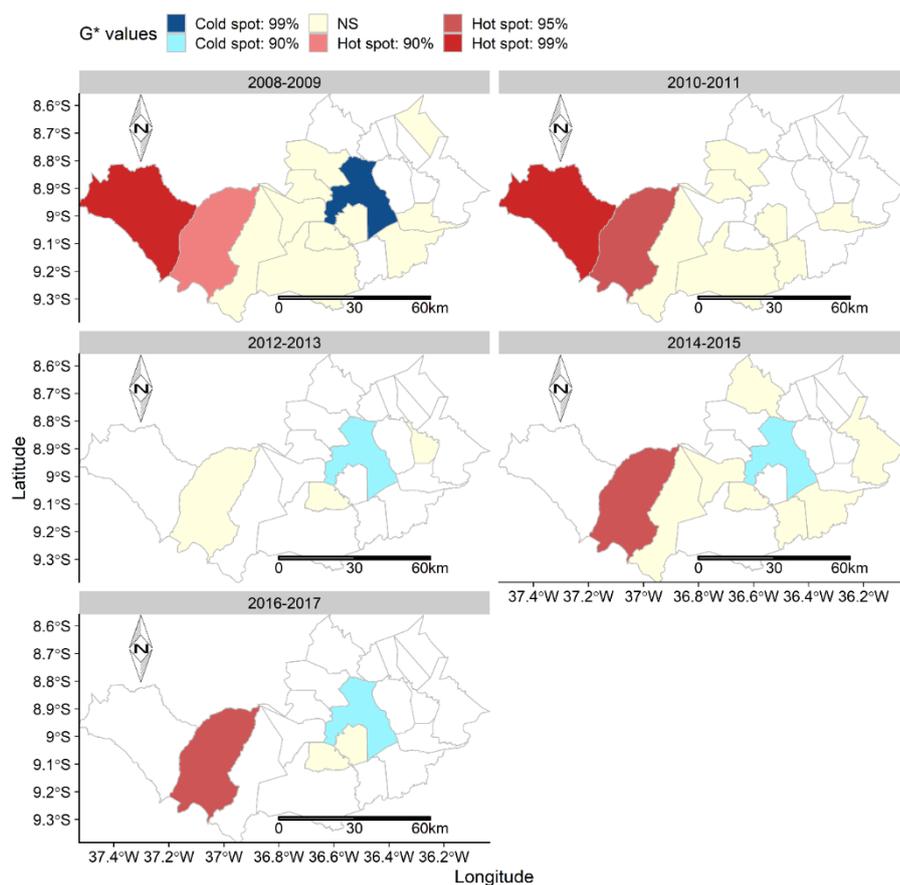


Figura 3 Pontos quentes e frios para triatomíneos examinados em áreas de peridomicílio em cada município. As áreas em branco correspondem a municípios dos quais não havia dados.

Para a TI, as análises geoespaciais identificaram que os dados foram homogeneamente distribuídos e não formaram aglomerados. No entanto, pontos quentes foram identificados em Canhotinho durante 2008-2009 e 2012-2013 e pontos frios foram detectados em Caetés de 2008 a 2018 e em Jucati durante o ano de 2018 (Figura 4).

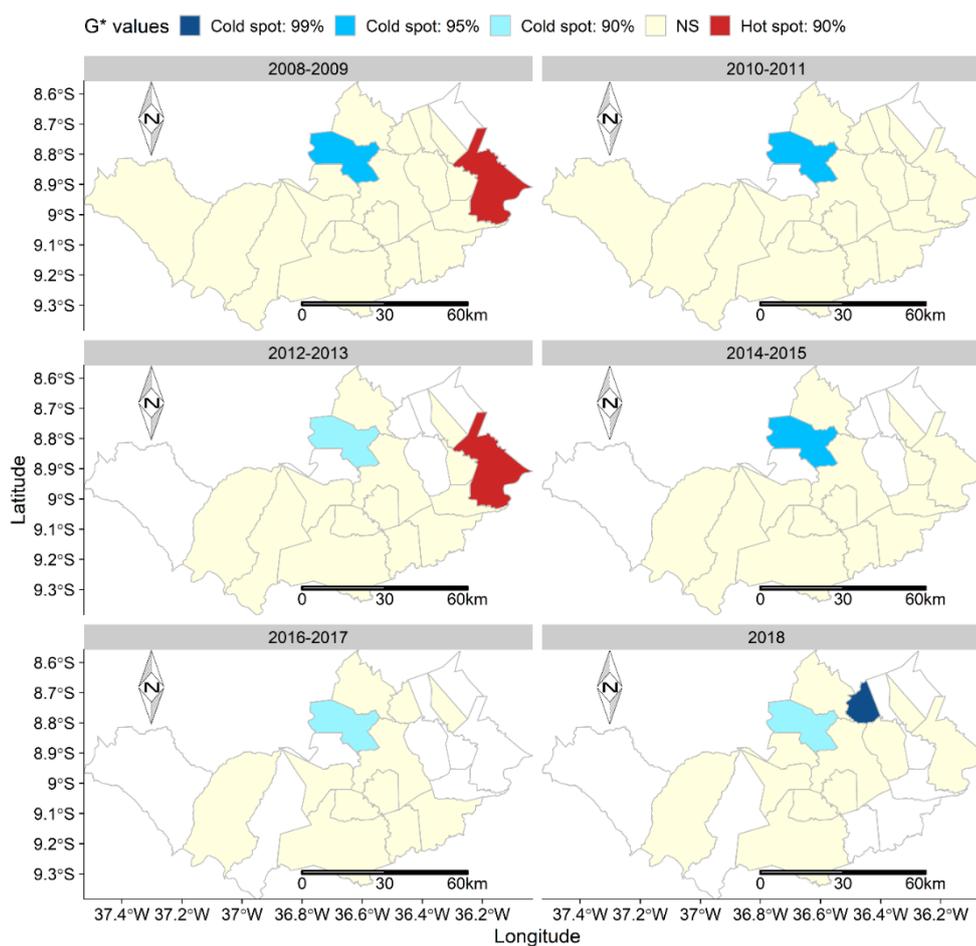


Figura 4 Pontos quentes e frios para a taxa de infecção dos triatomíneos examinados em cada município. As áreas em branco correspondem a municípios dos quais não havia dados

3.3 Regressão logística

De acordo com a regressão logística por espécie (*P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*), a probabilidade de infecção por *T. cruzi* permanece constante em exames com 50 espécimes ou mais (Figura 5).

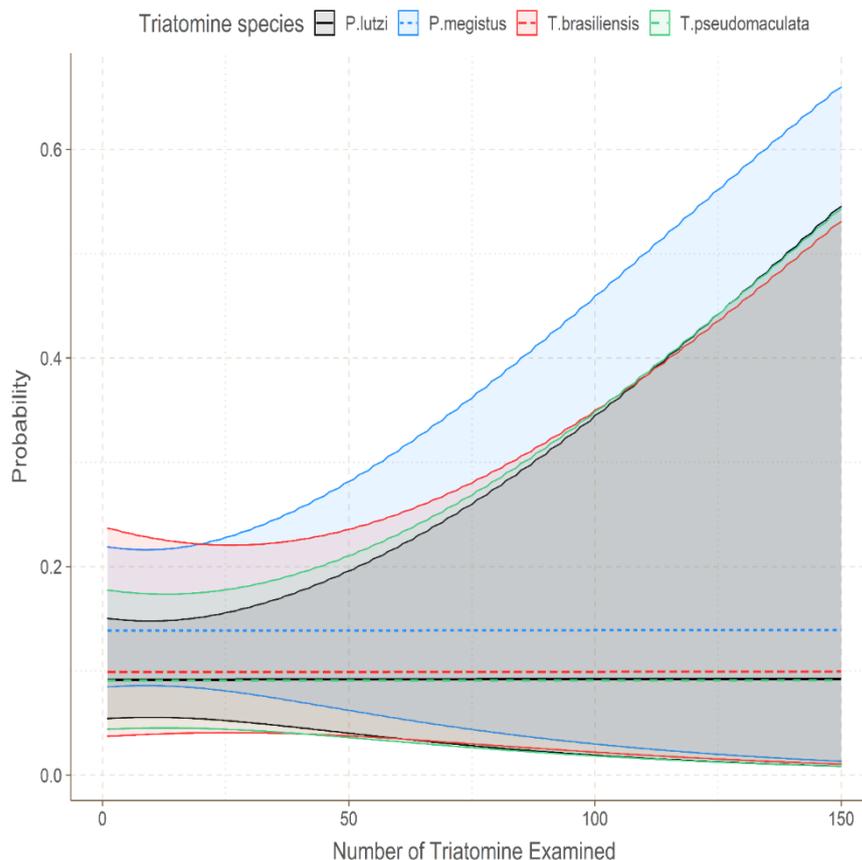


Figura 5 Probabilidade de uma espécie de triatomíneo infectado por *Trypanosoma cruzi* em relação ao tamanho da amostra examinada. O nível de 95% sobre os valores de probabilidade encontrados é fornecido na mesma cor para cada espécies.

4 Discussão

Este estudo relata o comportamento espaço-temporal de triatomíneos infectados por flagelados semelhantes a *T. cruzi*, coletados em áreas intradomiciliares e peridomiciliares de uma região endêmica para DC no Nordeste do Brasil. A TI global aqui obtida (10,29%) é semelhante ao relatado anteriormente (10%) no estado de Pernambuco (Silva et al., 2017). A maioria dos triatomíneos infectados foi coletada em áreas intradomiciliares, demonstrando o comportamento sinantrópico desses vetores (Silva et al., 2017). Esse achado indica um alarmante cenário considerando que a proximidade desses vetores com residências é um dos

principais fatores de risco para transmissão de *T. cruzi* (Fidalgo et al., 2018; Ribeiro et al., 2014).

É importante ressaltar que mais de 90% dos triatomíneos examinados foram coletados no intradomicílio, conseqüentemente quase todos os tripanosomatídeos (98,17%) foram detectados neste local. O alto número de espécies coletadas no intradomicílio também pode estar relacionado com sua atração por fontes de luz (por exemplo, lâmpadas) facilitando o estabelecimento de novas colônias em ambientes internos (Carbajal de la Fuente et al., 2007). Por outro lado, no peridomicílio, a abundância de abrigos pode ser difícil para a captura desses insetos durante a atividade de busca. Além disso, o método de captura (busca ativa) empregado pelo programa de vigilância entomológica apresenta baixa sensibilidade, e o número de espécimes capturados pode variar muito dependendo da densidade vetorial e das características do ecótopo (Abad-Franch et al., 2014).

A fauna de triatomíneos da região foi avaliada em 2012, e quatro espécies (*P. lutzi*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus* e *T. brasiliensis*) foram registrados (Silva et al., 2012). Recentemente, esta lista foi atualizada, e outras espécies (*T. melanocephala* [Neiva & Pinto, 1923], *T. infestans* e *Rhodnius* spp.) foram adicionadas (Silva et al., 2019). Apesar do intervalo de tempo entre os dois estudos e o aumento da diversidade de espécimes, fica claro que os triatomíneos mais comuns nesta área são aqueles epidemiologicamente importantes para a transmissão de *T. cruzi*.

Indivíduos pertencentes aos gêneros *Panstrongylus* (Berg, 1879) e *Triatoma* (Laporte, 1832) foram positivos para tripanosomatídeos semelhantes a *T. cruzi*. Embora apresentem diferentes características ecológicas, seu potencial como vetor não pode ser negligenciado. Por exemplo, *P. megistus* é o vetor mais importante de *T. cruzi* em muitas regiões brasileiras (Dias et al., 2016) e está associado com áreas intradomiciliares e peridomiciliares (como, tocas de animais, palmeiras e buracos de árvores) (Jurberg et al., 2017; Santos Júnior et al., 2011). A

capacidade de invadir e colonizar domicílios e a alta taxa de infecção por *T. cruzi* indicam que esta espécie é de grande importância epidemiológica no Brasil após o controle do *T. infestans* (Gurgel-Gonçalves et al., 2012).

Embora *P. lutzii* tenha sido considerada uma espécie secundária para vigilância epidemiológica, apresenta altas taxas de infecção natural e grande capacidade de invasão domiciliar; portanto, sua importância como vetor não pode ser subestimada (Fidalgo et al., 2018). Por outro lado, *T. brasiliensis* é uma das espécies mais importantes devido à sua ampla distribuição no bioma caatinga na região Nordeste (Silva et al., 2017). É importante notar que o comportamento alimentar promíscuo desta espécie facilita a circulação de *T. cruzi* entre ambientes antrópicos e silvestres (Daflon-Teixeira et al., 2019).

As características ecológicas de algumas espécies de triatomíneos têm sido bem estudadas; no entanto, deve-se atentar também para aquelas consideradas menos importantes epidemiologicamente, como *T. pseudomaculata*. Embora esta espécie tenha apresentado baixa taxa de infecção e de metaciclogênese para *T. cruzi* (Fidalgo et al., 2018; Perlowagora-Szumlewicz & Moreira, 1994), sua preferência por habitações como cavidades, cascas de árvores e galinheiros facilitam a invasão de áreas intradomiciliares, o que pode aumentar o risco de transmissão de *T. cruzi* (Barbosa-Silva et al., 2016).

A aparente redução gradual no número de insetos coletados (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*) durante todo o período do estudo pode ter sido influenciado pelo sucesso do programa de controle e evidente melhoria nas condições sanitárias da população que vive nesta área (Fidalgo et al., 2018). Apesar de importante, o achado da aparente redução gradual precisa ser interpretado com cautela, especialmente porque os esforços amostrais entre os anos podem ter influenciado nossos resultados. Por outro lado, a redução na TI provavelmente está relacionada ao número de espécimes examinados, no qual foi demonstrado que até 50 análises são suficientes para fornecer um valor confiável de TI.

Os achados da avaliação espaço-temporal revelaram a presença de pontos quentes e frios para triatomíneos examinados no intradomicílio e no peridomicílio. É importante destacar o município de Águas Belas como ponto quente e o município de Garanhuns como ponto frio durante todo o estudo. As áreas desses municípios fazem parte do bioma caatinga e apresentam atributos ecológicos que são favoráveis à manutenção de espécies de triatomíneos (Gurgel-Gonçalves et al., 2012). Portanto, essa diferença pode estar relacionada a execução das atividades pelo programa de controle de vigilância. Infelizmente, a frequência irregular de coleta de espécimes dificultou uma análise temporal mais precisa dos dados.

Em relação à TI, foi identificado um ponto quente no município de Canhotinho em dois períodos (2008–2009 e 2012-2013), indicando que, embora mínimo, considerando o número de espécimes coletados, o risco de infecção humana ainda existe. Por outro lado, a identificação de pontos frios em Caetés (de 2008 a 2018) e Jucati durante 2018 sugere que o risco de infecção nessas áreas foi menor neste período. Embora as análises geoespaciais não formaram aglomerados para a TI, as atividades de vigilância entomológica precisam ser contínuas e sistemáticas para evitar a transmissão de *T. cruzi* (Barbosa-Silva et al., 2019), pois triatomíneos positivos foram detectados em 90,48% dos municípios estudados. É importante notar que os pontos quentes para os espécimes coletados não corroboraram com pontos quentes para TI. Considerando que o número de espécimes coletados não influencia a probabilidade de infecção, essa diferença aqui relatada pode estar relacionada a condições epidemiológicas (por exemplo, intensidade de ação antrópica, capacidade de domiciliação e colonização de cada espécie) que permitem a circulação de *T. cruzi* nestes insetos, bem como em potenciais hospedeiros vertebrados.

Sabe-se também que a TI pode ser influenciada pela técnica de diagnóstico empregado pelo programa de controle de vigilância. Exame microscópico do trato digestivo de insetos apresenta sensibilidade limitada em amostras com baixo número de formas de

tripanosomatídeos. Além disso, ele não permite a diferenciação dos estágios do parasito, bem como a identificação adequada de tripanosomatídeos de *T. cruzi* (Moreira et al., 2017). Embora o exame microscópico seja considerado uma importante ferramenta para avaliar a TI dos programas de vigilância, o uso de técnicas moleculares mais sensíveis (PCR) pode aumentar a detecção de insetos infectados, o que pode contribuir para a implementação de medidas de prevenção para a DC (Cominetti et al., 2013).

Pesquisas anteriores realizadas na mesma área revelaram uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados (por exemplo, pássaros, roedores, cães, cabras e humanos) que são usados como fonte de sangue para triatomíneos (Silva et al., 2017). Por exemplo, aves domésticas, tradicionalmente criadas em quintais pela população local, desempenham um papel importante na manutenção de colônias de triatomíneos, já que são usadas como fonte de sangue. Da mesma forma, roedores e marsupiais, hospedeiros de *T. cruzi* (Bezerra-Santos et al., 2021; Jansen et al., 2018, 2020), também foram identificados como importante fonte de sangue para algumas espécies de triatomíneos detectadas neste estudo como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus* e *P. lutzii* (Silva et al., 2017). Considerando que as condições climáticas de todos os municípios aqui estudados não diferem, muito provavelmente a diversidade de hospedeiros vertebrados nestas áreas pode contribuir para a variação da TI, de acordo com a espécie de triatomíneo.

A análise de regressão logística realizada com algumas espécies (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*) demonstrou que a probabilidade de infecção por flagelados semelhantes a *T. cruzi* permanece constante em exames de 50 espécimes ou mais. Esse achado é notável, considerando que permite redução dos custos operacionais e do tempo, contribuindo para a sustentabilidade das atividades do PNCDCh, já que a avaliação de 50 amostras fornece um valor de TI confiável.

É importante destacar que esta área geográfica, onde foi realizado o estudo, também foi apontada como um dos 10 focos de doenças tropicais negligenciadas no mundo (Hotez, 2014). As diferenças de comportamento (áreas intradomiciliares e peridomiciliares) e distribuição de espécies de triatomíneos em regiões endêmicas para DC são explicados pela ecologia de cada microrregião, pelo tipo e intensidade de ação antrópica e pela capacidade de domiciliação e colonização de cada espécie, o que define sua importância epidemiológica em relação à DC (Dias et al., 2000).

Nossos achados fornecem um cenário nunca estudado, nesta área, através deste tipo de análise espaço-temporal. A identificação destes pontos quentes ao longo do tempo é fundamental para entender melhor a eco-epidemiologia de triatomíneos e seus patógenos associados. Esses dados serão úteis para a identificação de áreas de vulnerabilidade para triatomíneos infectados por *T. cruzi* e, conseqüentemente, maior risco de DC, incentivando a adoção de estratégias preventivas contra esses vetores. Finalmente, a aparente redução no número de espécimes coletados e TI pode indicar uma melhoria no serviço de vigilância local, bem como nas condições sanitárias em que a população humana reside.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Maria de Lourdes Rodrigues (V Gerência Regional de Saúde) pelo fornecimento dos dados aqui utilizados. Este artigo é baseado na tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) da primeira autora, desenvolvida na Universidade Federal Rural de Pernambuco, e apoiada por bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Abad-Franch, F., Diotaiuti, L., Gurgel-Goncalves, R. & Gurtler, R.E. (2013). Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 251–254. *doi*: 10.1590/0074-0276108022013022
- Abad-Franch, F., Valenca-Barbosa, C., Sarquis, O. & Lima, M.M. (2014). All that glisters is not gold: sampling-process uncertainty in disease-vector surveys with false-negative and false-positive detections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3187. *doi*: 10.1371/journal.pntd.0003187.
- Argolo, A.M., Félix, M., Pacheco, R. & Costa, J. (2008). *Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil*, Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio/Fundação Oswaldo Cruz/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- Barbosa-Silva, A.N., Câmara, A.C.J. da, Martins, K., Nunes, D.F., Oliveira, P.I.C., Azevedo, P.R.M., Chiari, E. & Galvão, L.M.C. (2016). 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*, 49, 57–67. *doi*: 10.1590/0037-8682-0300-2015.
- Barbosa-Silva, A.N., Souza, R.C.M., Diotaiuti, L., Aguiar, L.M.A., Câmara, A.C.J. & Galvão, L.M.C. (2019). Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, 1–8. *doi*: 10.1590/0037-8682-0061-2019.
- Bewick, V., Cheek, L., & Ball, J. (2005). Statistics review 14: Logistic regression. *Critical Care*, 9, 112–118. *doi*: 10.1186/cc3045.
- Bivand, R.S. & Wong, D.W.S. (2018). Comparing implementations of global and local indicators of spatial association. *TEST*, 27, 716–748. *doi*: 10.1007/s11749-018-0599-x.

- Brasil, (2019a). Ministério da Saúde. DATASUS – Tabnet. Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM: Mortalidade – Brasil. Retrieved from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
- Brasil, (2019b). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. 50, 1–10.
- Carbajal de la Fuente, A.L., Minoli, S.A., Lopes, C.M., Noireau, F., Lazzari, C.R. & Lorenzo, M.G. (2007). Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 101, 115–119. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.12.007.
- Cominetti, M.C., Almeida, R.F.C., Gonçalves, G.M.A. & Andreotti, R. (2013). Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46, 277–280. doi: 10.1590/0037-8682-0024-2013.
- Cominetti, M.C., Csordas, B.G., Cunha, R.C. & Andreotti, R. (2014). Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 747–755. doi: 10.1590/0037-8682-0234-2014.
- Coura, J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 113–122. doi:10.1590/S0074-02762007000900018.
- Daflon-Teixeira, N.F., Coutinho, C., Gomes, T.F., Toma, H.K., Duarte, R., Boia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., Almeida, C.E & Lima, M.M. (2019). Multiple approaches to address potential risk factors of Chagas disease transmission in northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 296–302. doi: 10.4269/ajtmh.18-0480.

- Dias, J.C.P., et al. (2016). II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 7–86. doi: 10.5123/s1679-49742016000500002.
- Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Fernandes, A.L., & Vinhaes, M.C. (2000). Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 16, 13–34. doi: 10.1590/S0102-311X2000000800003.
- Dias, J.V.L., Queiroz, D.R.M., Martins, H.R., Gorla, D.E., Pires, H.H.R. & Diotaiuti, L. (2016). Spatial distribution of triatomines in domiciles of an urban area of the Brazilian Southeast Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111, 43–50. doi: 10.1590/0074-02760150352.
- Dohoo, I., Martin, W. & Stryhn, H. (2003). *Veterinary epidemiologic research* (S. M. McPike Ed.). Transcontinental Prince Edward Island, Canada, AVC Inc.
- Fidalgo, A.S.O.B.V., Costa, A.C. da, Silva Filho, J.D., Candido, D.S., Freitas, E.C., Pereira, L.S., Andrade, M.C., Gomes, K.C.M.S., Bezerra, C.M. & Oliveira, M.F. (2018). Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51, 174–182. doi: 10.1590/0037-8682-0408-2017.
- Fischer, M. M. & Getis, A. (2009). *Handbook of applied spatial analysis: software tools, methods and applications*, Springer Science & Business Media.
- Galvão, C. (2014). *Vetores da doença de chagas no Brasil*, Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia.
- Getis, A. & Ord, J.K. (1992). The analysis of spatial association by use of distance statistics. *Geographical Analysis*, 24, 189–206. doi: 10.1111/j.1538-4632.1992.tb00261.x.
- Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J. & Peterson, A.T. (2012). Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine*. 1–16. doi: 10.1155/2012/705326.

- Hotez, P.J. (2014). Ten global "hotspots" for the neglected tropical diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2496. doi: 10.1371/journal.pntd.0002496.
- Jansen, A.M., Xavier, S.C.C. & Roque, A.L.R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11,1–25. doi: 10.1186/s13071-018-3067-2.
- Jansen, A.M., Xavier, S.C.C. & Roque, A.L.R. (2020). Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2020.00010
- Jurberg, J., Rodrigues, J.M.S., Dale, C., Lamas Jr, V.D., Peixoto, S.R., Silva, J.V.T. & Rocha, G.D.S. (2017). Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163, 127–520.
- Lesnoff, M. & Lancelot, R. (2012). Analysis of overdispersed data (Version R package version 1.3.1). Retrieved from <http://cran.r-project.org/package=aod>
- Machado, F.S. & Tanowitz, H.B. 86 - Chagas Disease. In: JONG, E. C., Stevens, D. L., & Netter, F. H. (2012). *Netter's infectious diseases*. Philadelphia, PA, Elsevier/Saunders. Pages 522–526.
- Moreira, O.C., Verly, T., Finamore-Araujo, P., Gomes, S.A.O., Lopes, C.M., Sousa, D.M., Azevedo, L.R., Mota, F.F., d'Avila-Levy, C.M., Santos-Mallet, J.R. & Britto, C. (2017). Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasites & Vectors*, 10, 1–14. doi: 10.1186/s13071-017-2343-x.

- Pebesma, E. (2018). Simple features for R: standardized support for spatial vector data. *The R Journal*, 10, 439–446. doi:10.32614/RJ-2018-009.
- Perdue, M.L. & Seal, B.S. (2000). “15 - Impact of Avian Viruses”. In Christon, J.N. (Ed.), *Viral Ecology*, San Diego: Academic Press, pp. 549–592.
- Perlowagora-Szumlewicz, A. & Moreira, C.J.D.C. (1994). In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*-1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 603–618. doi: 10.1590/S0074-02761994000400018.
- Pfeiffer, D., Robinson, T.P., Stevenson, M., Stevens, K.B., Rogers, D.J. & Clements, A.C. (2008). *Spatial analysis in epidemiology I*, Great Britain: Oxford University Press Oxford.
- R Core Team (Version 3.6). (2019). Vienna, Austria. from <https://www.R-project.org/>
- Ribeiro, A.R., Mendonça, V.J., Alves, R.T., Martinez, I., Araújo, R.F., Mello, F. & Rosa, J.A. (2014). *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 48, 295–302. doi: 10.1590/S0034-8910.2014048004719.
- Ribeiro-Júnior, G., Dos Santos, C., Lanza, F., Reis, J., Vaccarezza, F., Diniz, C., Miranda, D.L.P., Araújo, R.F., Cunha, G.M., Carvalho, C.M.M., Fonseca, E.O.L., Santos, R.F., Sousa, O.M.F., Reis, R.B., Araújo, W.N., Gugel-Gonçalves, R. & Reis, M.G. (2019). Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasites & Vectors*. 12, 1–10. doi: 10.1186/s13071-019-3849-1.
- Santos Júnior, J.E. dos, Diotaiuti, L. & Dias, J.C.P. (2011). First report of *Panstrongylus megistus* sylvatic focus in municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 510–513. doi: 10.1590/S0074-02762011000400022.
- Sarquis, O., Carvalho-Costa, F.A., Toma, H.K., Georg, I., Burgoa, M.R. & Lima, M.M. (2012). Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T.*

- pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitology Research*, 110, 1481–1485. doi: 10.1007/s00436-011-2651-6.
- Schmuñis, G.A. (2000). “A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública da Américas”, In Brener, Z., Andrade, Z. & Barral-Netto, M. (Ed), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, pp.84–98.
- Silva, M.B.A., Barreto, A.V.M.S., Silva, H.A., Galvão, C., Rocha, D., Juberg, J. & Gurgel-Gonçalves, R. (2012). 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*, 45, 60–65. doi: 10.1590/S0037-86822012000100012.
- Silva, M.B.A., Menezes, K.R., Farias, M.C.G., Andrade, M.S., Victor, C.C.A., Lorosa, E.S. & Juberg, J. (2017). 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*, 50, 543–546. doi: 10.1590/0037-8682-0334-2016.
- Silva, T.R.M., Barros, G.M.M.R., Lima, T.A.R.F., Giannelli, A., Silva, G.M., Alves, K.M.L., Carvalho, G.A. & Ramos, R.A.N. (2019). Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, 1–5. doi: 10.1590/0037-8682-0278-2019.
- Thrusfield, M., Christley, R., Brown, H. (2018). *Veterinary Epidemiology*, 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK: John Wiley & Sons, Inc.
- Wickham, H. (2017). tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse' (Version version 1.2.1). cran.r-project. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>.

5. Considerações finais

- Triatomíneos das espécies *P. lutzi*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *P. megistus* foram as mais frequentes na área de estudo, capturados, principalmente, no intradomicílio.
- A frequência de infecção por *T. cruzi* em triatomíneos foi de 12,09% por métodos moleculares.
- A linhagem de *T. cruzi*, TcI foi prevalente na área de estudo, sendo detectada nas espécies *P. megistus*, *P. lutzi*, *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*. Enquanto, TcIII/TcIV foram detectadas em *P. megistus* e *P. lutzi*.
- Os municípios de Bom Conselho, Calçado, Jupi, Saloá apresentaram as maiores frequências de triatomíneos infectados por *T. cruzi*.
- Em 90,48% dos municípios estudados foram identificados vetores positivos para infecção por *T. cruzi*, ressaltando a importância de ações de vigilância entomológica contínua e sistemática para evitar a transmissão por este protozoário a humanos e animais.
- Recomendamos que, na área de estudo, sejam feitos trabalhos de educação em saúde com a população para que possam identificar, capturar de forma segura os vetores e enviar aos Postos de Identificação de Triatomíneos para exame. Além disso, é importante que as equipes de vigilância em saúde tenham continuidade na pesquisa de triatomíneos para que as ações de busca ativa possam identificar as áreas infestadas.

ANEXO 1

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine
Vol.:52:e20190278: 2019
doi: 10.1590/0037-8682-0278-2019



Major Article

Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil

Tatiene Rossana Motta Silva^[1], Guilherme Mota Maciel do Rêgo Barros^[2],
Thiago Antonio Rodrigues Freire Lima^[3], Alessio Giannelli^[4],
Gesika Maria da Silva^{[1],[5]}, Karla Michelle de Lima Alves^[5],
Gílcia Aparecida de Carvalho^[2] and Rafael Antonio Nascimento Ramos^[2]

[1]. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal Tropical, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

[2]. Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil.

[3]. Departamento de Engenharia Cartográfica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

[4]. Poulpharm BVBA, Izegem, Belgium.

[5]. V Gerência Regional de Saúde, Secretaria Estadual de Saúde, Garanhuns, PE, Brasil.

Abstract

Introduction: *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease (CD), a zoonotic infection transmitted by triatomine bug vectors to human beings. Although the story of this parasitic infection was born in Brazil and here this has made major step forward information, the same cannot be said about the actual distribution of the triatomine vector in several areas of this country. The aim of this study was to assess the occurrence of triatomine species in an endemic region for CD in Northeastern Brazil. **Methods:** A retrospective study was performed using data obtained from 2008 to 2017. All information was provided by the *V Gerência Regional de Saúde* of the state of Pernambuco. The spatial distribution of triatomine species was analyzed by drawing a map using the Quantum geographic information system. **Results:** A total of 4,694 triatomine specimens (469.4 ± 221.2 per year) were collected during the period 2008-2017, with 94.5% (4,434/4,694) at the intradomicile and 5.5% (260/4,694) at peridomicile environment. Of all arthropods collected, 92.5% (4,340/4,694) and 7.5% (354/4,694) were adults and nymphs, respectively. The species most frequently detected were *Panstrongylus lutzi* (30.36%), *Triatoma brasiliensis* (26.12%), *Triatoma pseudomaculata* (22.43%), and *Panstrongylus megistus* (20.54%). **Conclusions:** These data contribute to a better understanding of the distribution of *T. cruzi* infection in the Northeastern region of Brazil. Preventive measures based on vector control should be implemented in the study area in order to reduce the burden this neglected tropical disease.

Keywords: Vector. American trypanosomiasis. Epidemiology. Brazil.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) is acknowledged as the etiological agent of Chagas disease (CD). This parasitic infection is currently considered as one of the most important neglected tropical diseases and is a major threat to public health, with an annual incidence of 28,000 cases and up to 12,000 deaths in the Americas alone¹. The transmission of the CD relies on occurrence of triatomine vectors (e.g.,

Triatoma infestans, *Panstrongylus megistus* and *Rhodnius robustus*) that carry the infecting form of the protozoon (i.e., metacyclic trypomastigotes) in their fecal fluids, which are detected near the site of the bite wound after a blood meal. Alternatively, *T. cruzi* comes into contact with vertebrate hosts through intact mucosal membranes, such as the conjunctiva². Furthermore, in recent years additional routes of transmission such as blood transfusion, organ transplantation, and transplacental and oral transmission have acquired importance³.

The vectors of *T. cruzi* are hematophagous insects (Reduviidae: Triatominae) belonging to a group of 148 species, 65 of which occur in Brazil². Approximately ten species are epidemiologically important for the transmission of CD⁴. In Brazil, the presence of these reduviids has been

Corresponding author: Dr. Rafael A. N. Ramos.

e-mail: rafaelnramos10@yahoo.com.br

Orcid: 0000-0002-0347-9358

Received 8 June 2019

Accepted 24 September 2019

reported in different regions, since they are adapted to distinct ecotypes^{5,6}. These specimens may live in intradomiciliary and peridomiciliary environments^{7,8}. Peridomiciliary ecotypes, including animal facilities and building remains, play an important role as a bridge between the domestic and wild cycles of the disease^{8,9}.

Only a few epidemiological surveys have been conducted in distinct Brazilian regions so far. For instance, in the Southeast region, *P. megistus* has been retrieved in urban areas¹⁰, while in the South Brazil, *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria*¹¹ have been reported as the most commonly detected species. In the Northeastern region species such as *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus lutzi* and *Triatoma pseudomaculata* are frequently reported^{7,9,12}. It is important to note that several natural environments in this region (e.g., xerophilous trees and rocks) are inhabited by triatomines¹³.

Data on the distribution of these vectors is needed to better understand the epidemiological aspects related to the transmission of CD and to drive preventive interventions⁷. Therefore, the aim of this study was to assess the occurrence and distribution of triatomine species in an endemic region for CD in Northeastern Brazil.

METHODS

Study area

The study was conducted in the microregion of Garanhuns (Latitude 8°53'27" South and Longitude 36°29'48" West), state of Pernambuco, Northeastern Brazil (Figure 1). The area includes 21 municipalities, and it is featured by a semi-arid climate with a mean annual temperature of 22°C (17 - 30°C), mean annual rainfall of 147 mm (25 - 295 mm), and relative air humidity of 90%.

From 2007 to 2015, 773 cases of CD were recorded in the study area, with an annual average of 85.8 cases per year¹⁴.

Study design and data analysis

A retrospective study was performed using data obtained from 2008 to 2017. All data were provided by the *V Gerência Regional de Saúde* of the state of Pernambuco, and were taken from the National Chagas Disease Control Program.

Information about vector species, life stage, area of capture, and municipality were obtained, and the absolute and relative frequencies were calculated. In addition, the Chi-square test (χ^2) with Yates correction (5% significance level) was used to compare the positivity between species and area of capture (intradomicile or peridomicile), and between stages and area of capture. The BioEstat software (version 5.3) was used for these analyses¹⁵.

The spatial distribution of triatomine species were analyzed by drawing a map using the Quantum geographic information system (QGIS 3.2 BONN). The Jenks optimization method was used to organize the data, and subsequently construct a histogram of frequencies to identify clustering¹⁶.

RESULTS

A total of 4,694 triatomine specimens (469.4 ± 221.2 per year) were collected during the study period, with 94.5% (4,434/4,694) and 5.5% (260/4,694) from the intradomiciliary- and peridomiciliary- environments, respectively. A highly significant difference was observed between the most common species and area of capture ($\chi^2 = 50.363$; $p = 0.0000$), and between life stages and area of capture ($\chi^2 = 112.496$; $p = 0.0000$). The largest number of specimens collected in a single year (17.3%; 870/4,694) was obtained during 2008. Of all invertebrates collected 92.5% (4,340/4,694) and 7.5% (354/4,694) were adults and nymphs, respectively (Table 1). The reduviid species most frequently reported were *P. lutzi* (30.36%), *T. brasiliensis* (26.12%), *T. pseudomaculata* (22.43%), and *P. megistus* (20.54%) (Table 1).

Figure 2 illustrates the spatial distribution of triatomine collected in the study area.

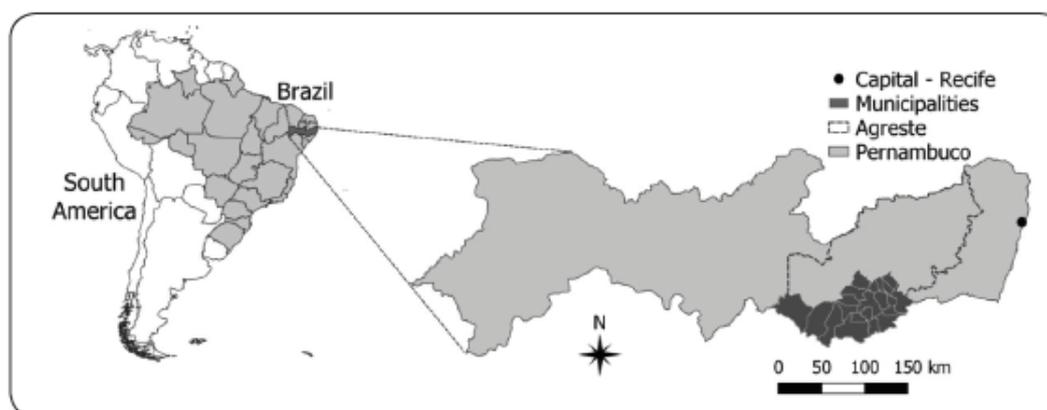


FIGURE 1: Study area located at the microregion of Garanhuns, state of Pernambuco, Northeastern Brazil.

TABLE 1: Triatomine species collected in intra- and peridomicile areas from 2008 to 2017.

| Species | Intradomicile | | | Peridomicile | | | Total | Relative frequency (%) |
|--------------------------------|---------------|------------|--------------|--------------|-----------|------------|--------------|------------------------|
| | adults | nympha | total | adults | nymphs | total | | |
| <i>Panstrongylus lutzii</i> | 1375 | 14 | 1389 | 36 | 0 | 36 | 1425 | 30.36 |
| <i>Triatoma brasiliensis</i> | 968 | 194 | 1162 | 44 | 20 | 64 | 1226 | 26.12 |
| <i>Triatoma pseudomaculata</i> | 943 | 39 | 982 | 42 | 29 | 71 | 1053 | 22.43 |
| <i>Panstrongylus megistus</i> | 834 | 43 | 877 | 72 | 15 | 87 | 964 | 20.54 |
| <i>Triatoma</i> spp. | 12 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.09 |
| <i>Triatoma melanocephala</i> | 8 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0.25 |
| <i>Rhodnius</i> spp. | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0.09 |
| <i>Panstrongylus</i> sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0.02 |
| <i>Triatoma infestans</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0.02 |
| Total | 4,144 | 290 | 4,434 | 196 | 64 | 260 | 4,694 | 100 |

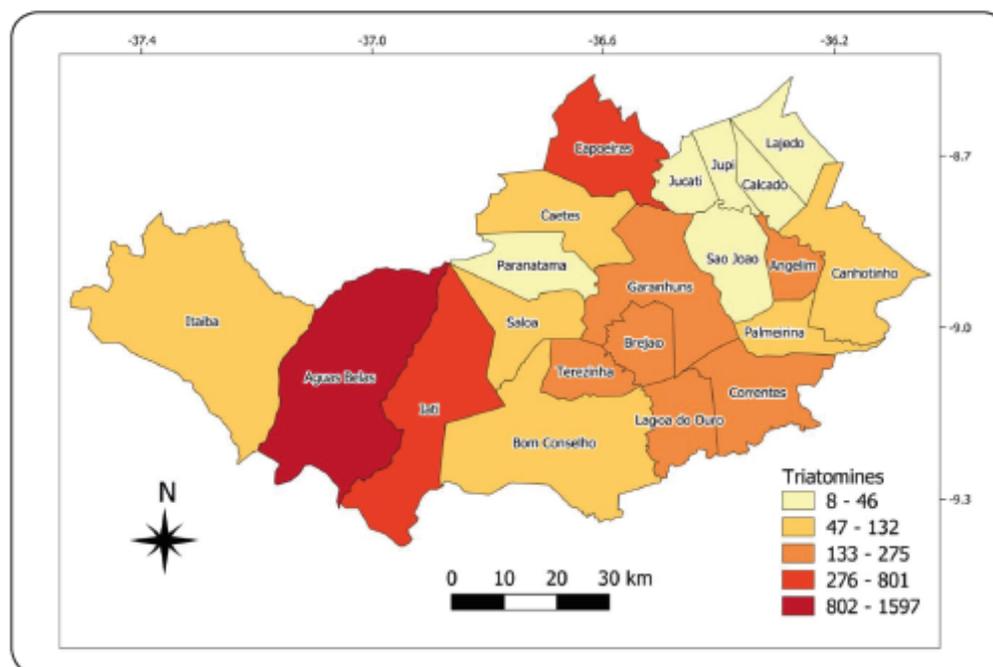


FIGURE 2: Distribution of triatomines collected at the study area from 2008 to 2017.

DISCUSSION

This study reports the occurrence of vectors of CD in intradomiciliary and peridomiciliary areas of an endemic region of Northeastern Brazil. The percentage of specimens collected from intradomiciliary areas is similar to a previous study conducted in the same area, where 92.4% of triatomines were collected indoors¹⁷. These invertebrates usually live in wild environments, however due to the degradation of their natural

habitats, synanthropic triatomines are frequently reported¹⁸. These arthropods are attracted by light sources in intradomicile areas¹⁹ or may be passively transported by accumulated wood or unused furniture near the houses (outdoors) inhabited by them and other synanthropic animals such as marsupials and rodents²⁰.

In the study area, the vigilance of these vectors occurs both actively and passively. During the study period (2008 to 2017) a gradual reduction in the number of specimens was observed,

which may be related to an improvement in the sanitary conditions of the population. Nonetheless, the risk of vector proliferation increases with a decrease in vigilance.

Both nymphs and adults were retrieved from intradomiciliary and peridomiciliary areas. The dispersion of triatomines in different environments may be related to mating or a search for food¹⁹. In this study, the presence of nymphs intradomicile indicates the formation of colonies in these environments represented by the phenomenon of domiciliation, and consequently high risk for human infection^{3,12}.

Various species were captured during the study (i.e., *P. lutzi*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *P. megistus*), with *P. lutzi* being the most frequent (30.36%). This species had been already detected in other Brazilian regions^{12,17}, and is relevant for the persistence of CD in endemic areas²¹. From an epidemiological perspective, *P. lutzi* plays a crucial role in the dynamic of *T. cruzi* infection in Northeastern Brazil, since it feeds on a wide plethora of hosts (e.g., birds, rodents, marsupials, dogs, goats, and humans), many of which are commonly found within the study area⁹. On the other hand, *T. brasiliensis*, apparently associated with rodents has been considered one of the most important vectors of *T. cruzi* in Brazil, using as a shelter the cactus specie *Pilosocereus gounellei* commonly found in the Northeastern region²².

Similarly, *T. pseudomaculata* and *P. megistus* share a similar natural habitat and hosts. Interestingly, *T. pseudomaculata* has been captured in wild ecotypes of *Mimosa tenuiflora* (commonly known as *jurema-preta*), a native vegetation found in the study area²⁰. Although less frequently, species of genus *Rhodnius* have been detected in the area of the present study¹⁷.

Findings contribute to a better understanding of the dynamics of CD in the Northeastern region of Brazil. The poor quality of housing materials and homes, especially in rural areas, provides a favorable environment for the proliferation of triatomine vectors. Unfortunately, vector transmission of CD in Brazil still occurs, and the domiciliation of the vectors observed in this study is a risk factor for the occurrence of the disease. Therefore, preventive measures based on vector control should be implemented in the study area in order to reduce the incidence of CD.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank to Maria L.R. Rodrigues (*V Gerência Regional de Saúde*) for providing the data.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

This article is based on the PhD thesis (Postgraduate Program in Tropical Animal Science) of the first author, developed at the Federal Rural University of Pernambuco, with support from a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Pan American Health Organization. Chagas disease [Internet]. Washington: Pan American Health Organization; 2019 [cited 2019 May 20]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40242&lang=en
2. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. 289p.
3. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(3):277-282.
4. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, et al. Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil - vetores da doença de Chagas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2014. 58p.
5. Parente CC, Bezerra FSM, Parente PI, Dias-Neto RV, Xavier SCC, Ramos Jr AN, et al. Community-Based Entomological Surveillance Reveals Urban Foci of Chagas Disease Vectors in Sobral, State of Ceará, Northeastern Brazil. PLoS One. 2017;1-11.
6. Dias JVL, Queiroz DRM, Martins HR, Gorla DE, Pires HHR, Diotaiuti L. Spatial distribution of triatomines in domiciles of an urban area of the Brazilian Southeast Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(1):43-50.
7. Fidalgo ASOBV, Costa AC, Silva Filho J D, Cândido DS, Freitas EC, Pereira LS, et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2018;51(2):174-82.
8. Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. Parasitol Res. 2012; 110(4):1481-5.
9. Silva MBA, Menezes KR, Farias MCG, Andrade MS, Victor CCA, Lorosa ES, et al. Description of the feeding preferences of triatomine in the Chagas disease surveillance study for the State of Pernambuco, Brazil (Hemiptera: Reduviidae). Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(4):543-6.
10. Ribeiro AR, Oliveira RC, Ceretti Junior W, Lima L, Almeida LA, Nascimento JD, et al. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(2):183-9.
11. Ribeiro AR, Mendonça VJ, Alves RT, Martinez I, Araújo RF, Mello F, et al. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Saude Publica. 2014;48(2):295-302.
12. Melo CM, Cruz ACFG, Lima AFVA, Silva LR, Madi RR, Jeraldo VL, et al. Triatomine fauna and recent epidemiological dynamics of Chagas disease in an endemic area of Northeast Brazil. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018;2018:1-13.
13. 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(1):14-9.
14. Ministério da Saúde (MS). Sistema de Informação de Atenção Básica – SIAB. Cadastro familiar, Pernambuco. DATASUS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015 [cited 2019 Jan 10]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defhttm.exe?siab/cnv/SIABFPE.def>.

15. Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT – statistical applications on the biomedical sciences. Ong. Mamirauá. 2007.
16. Ramos APM, Marcato Junior J, Decanini MMS, Pugliesi EA, Oliveira RF, Paranhos Filho C. Avaliação qualitativa e quantitativa de métodos de classificação de dados para o mapeamento coroplético. Rev Bras Cartogr. 2016;68(3):609-29.
17. Silva MBA, Barrero 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(1):60-5.
18. 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(6):747-55.
19. Carbajal De La Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Notreau F, Lazzari CR, Lorenzo M. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. Acta Trop. 2007;101(2):115-9.
20. Freitas SPC, Freitas ALC, Prazeres SM, Gonçalves TCM. Influência de hábitos antrópicos na dispersão de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espinola, 1964, através de *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) no Estado do Ceará, Brasil. Cad Saúde Pública. 2004;20(1):333-6.
21. Caranha L, Lorosa ES, Rocha DS, Jurberg J, Galvão G. Estudo das fontes alimentares de *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado do Ceará. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(4):347-51.
22. Valença-Barbosa C, Lima MM, Sarquis O, Bezerra CM, Abad-Franch F. Short Report: A common Caatinga cactus, *Pilosocereus gounellei*, is an important ecotope of wild *Triatoma brasiliensis* populations in the Jaguaribe Valley of Northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(6):1059-62.

ANEXO 2

J Parasit Dis
<https://doi.org/10.1007/s12639-021-01418-6>



ORIGINAL ARTICLE



Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs of the triatomine species in a Chagas disease endemic area

Tatiene Rossana Mota Silva¹ · Thaynadia Gomes Rios² · Carlos Alberto do Nascimento Ramos² · Alessandra Scofield³ · Thiago Antonio Rodrigues Freire Lima⁴ · Leucio Câmara Alves⁵ · Rafael Antonio Nascimento Ramos¹ · Glicia Aparecida de Carvalho¹

Received: 29 May 2021 / Accepted: 12 July 2021
 © Indian Society for Parasitology 2021

Abstract *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, a neglected tropical infection with great public health importance. This protozoan has triatomine insects as vector but may also be transmitted through blood transfusion, organ transplants, ingestion of contaminated food, or congenitally. It has a heterogeneous population classified into Discrete Typing Units (DTUs), TcI–TcVI and TcBat. The aim of this study was to molecularly characterize the DTUs of *T. cruzi* in triatomines from a Chagas disease endemic area in Northeastern Brazil. Triatomines were collected and the gut content was microscopically analyzed to investigate the presence of trypanosomatid flagellates. In addition, digestive tracts of some specimens were dissected and molecularly analyzed through PCR for *Trypanosoma* spp. and sequencing. PCR positive samples were further submitted to a multiplex PCR for DTUs of *T. cruzi*. A total of 117 triatomines were collected, 93.16% being in intradomicile and 6.84% in peridomicile environments. Insects were identified as

Panstrongylus lutzi (37.60%), *Triatoma pseudomaculata* (26.50%), *Triatoma brasiliensis* (23.08%) and *Panstrongylus megistus* (12.82%). The specimens herein analyzed presented infection rates by *T. cruzi* of 5.49% and 12.09% in parasitological and molecular examinations, respectively. Multiplex PCR screening revealed 70.59% of the TcI genotype, detected in all triatomine species identified in this study and 29.41% of the DTU TcIII/TcIV detected in *P. megistus* and *P. lutzi*. *T. cruzi* infect triatomines in intradomicile and peridomicile environments, which brings attention to the risk of human infections and to the importance of the implementation of surveillance and entomological control actions.

Keywords Discrete typing units · Triatominae · Chagas disease vectors · Northeastern Brazil

Introduction

Protozoa of the Trypanosomatidae Family have been causing important diseases of public health concern for a long time. Amongst these parasites, *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) has been identified as the etiological agent of Chagas disease or American trypanosomiasis, a neglected tropical zoonosis still presents in Latin America. Kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) act as vectors of this protozoan, mainly in developing countries where poor housing conditions of the population facilitate the infestation of insect vectors (Barbosa-Silva et al. 2019). It may also be transmitted through blood transfusion, organ transplant, ingestion of contaminated food, and congenitally. Currently, it is believed that approximately 8 million people are infected worldwide, with over 10,000 deaths every year (WHO 2021).

✉ Rafael Antonio Nascimento Ramos
 rnael.ramos@ufape.edu.br

¹ Laboratory of Parasitology, Federal University of Agreste of Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco 55292-270, Brazil

² Department of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79070-900, Brazil

³ Institute of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará 68746-360, Brazil

⁴ Department of Cartographic Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 50740-530, Brazil

⁵ Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 52171-900, Brazil

It is known that *T. cruzi* has a heterogeneous population with a genetic diversity currently classified into Discrete Typing Units (DTUs), denoted TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI and TcBat (Marcili et al. 2009a; Zingales et al. 2009, 2012). In Brazil, all DTUs have been reported in different biomes (Jansen et al. 2018) and isolated from wild and domestic hosts (Marcili et al. 2009b; Bezerra et al. 2014; Jansen et al. 2018), as well as from triatomines recovered from domestic or sylvatic habitats (Cominetti et al. 2014; Martins et al. 2015; Ribeiro et al. 2016; Barbosa-Silva et al. 2016; Bezerra et al. 2018; Jansen et al. 2018; Lima-Oliveira et al. 2020).

TcI has a wide geographical distribution throughout the American continent and different mammalian (e.g., opossums, rodents, primates, and anteaters) and triatomine species [e.g., *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espinola, 1964, *Rhodnius nasutus* Stål, 1859, *Rhodnius pictipes* Stål, 1872] are involved in the sylvatic cycle (Zingales et al. 2012; Zingales 2018). It has also been isolated from domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) (Bezerra et al. 2014). Conversely, TcII is predominantly found in southern and central regions of South America, being rarely reported in North America (Zingales 2018). This DTU has been detected especially in bats, primates, rodents, marsupials, coatis (Jansen et al. 2015, 2018); and triatomine vectors (Lilioso et al. 2017; Daño et al. 2018).

TcIII is geographically distributed from northeastern Venezuela to Argentina, being predominantly associated with the sylvatic cycle (Zingales 2018). This DTU is commonly found in terrestrial and fossorial ecotopes, having armadillos of the genera *Dasypus*, *Chaetophractus* and *Euphractus* acting as main reservoirs (Zingales et al. 2012; Zingales 2018), but they can also be found in marsupials (e.g., *Didelphis* spp., *Monodelphis* spp.), rodents (e.g., *Galea spixii*), and humans (Abolis et al. 2011; Zingales et al. 2012; Martins et al. 2015). Similarly, TcIV is mostly related with the sylvatic cycle, being reported in North and South America. The main hosts for this DTU in South America are wild primates and coatis (*Nasua nasua*), whereas raccoons act as important reservoirs in North America (Zingales 2018).

TcV and TcVI are rare in the wild cycle and data about their host range is scant. In fact, some reports have been performed in mammalian hosts of the genera *Dasypus*, *Euphractus* and *Octodon* (Zingales et al. 2012). In Brazil, TcVI has been isolated in *T. brasiliensis* (Lima-Oliveira et al. 2020), and both DTUs (TcV and TcVI) have been associated with cardiomyopathy and mega syndromes in humans (Zingales et al. 2012). Lastly, TcBat has been isolated from *Myotis* spp., *Noctilio* sp., and humans (Marcili et al. 2009a; Ramírez et al. 2014), and it was also

detected in *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Cominetti et al. 2014).

Despite of all efforts of Brazilian Health Service, Chagas disease is still a real trouble for indigenous populations living in endemic areas. In some regions the domiciliation of triatomine species increase the risk of human and animal infection as it has been observed with the increase of reports of *T. cruzi* infection in dogs over the last five years. Therefore, investigations on naturally infected *T. cruzi* vectors, as well as the genotypic characterization of this protozoan contribute to the understanding of the eco-epidemiology of Chagas disease, facilitating decisions on preventive measures to reduce the risk for human and animal infections. The aim of this study was to detect different DTUs of *T. cruzi* in triatomines from a Chagas disease endemic area in Northeastern Brazil.

Methods

Study area

The study was performed in the state of Pernambuco, Northeastern region of Brazil (Fig. 1). The area is comprised of 21 municipalities belonging to the micro region of Garanhuns (Latitude 8°53'27" South and Longitude 36°29'48" West), and it is featured by a semi-arid climate with average annual temperature of 22 °C (ranging from 17 °C to 30 °C), rainfall mean of 147 mm (ranging from 25 to 295 mm) and air relative humidity of 90%.

All rural communities in this region have similar landscapes, with residences located near forest fragments and the presence of native palm trees. Dogs, cats and chickens are frequently reported in these domiciles.

Triatomine collection and morphological identification

From July 2018 to June 2019, triatomine specimens were actively collected with the aid of tweezers in intradomicile (e.g., bed frames, stored objects, boxes, walls, pictures stuck on walls) and peridomicile (e.g., chicken coops, pigpens, cattle sheds, piles of tiles, wood and bricks) areas that could serve as natural shelter for these insects. Two operators performed each sampling between 8 and 12 am for a period of 30 min. Afterwards, samples were placed in plastic vials and transported to laboratory for morphological identification (Lent and Wygodzinsky 1979). Information about vector species, life stage, site of capture, and municipality were recorded.

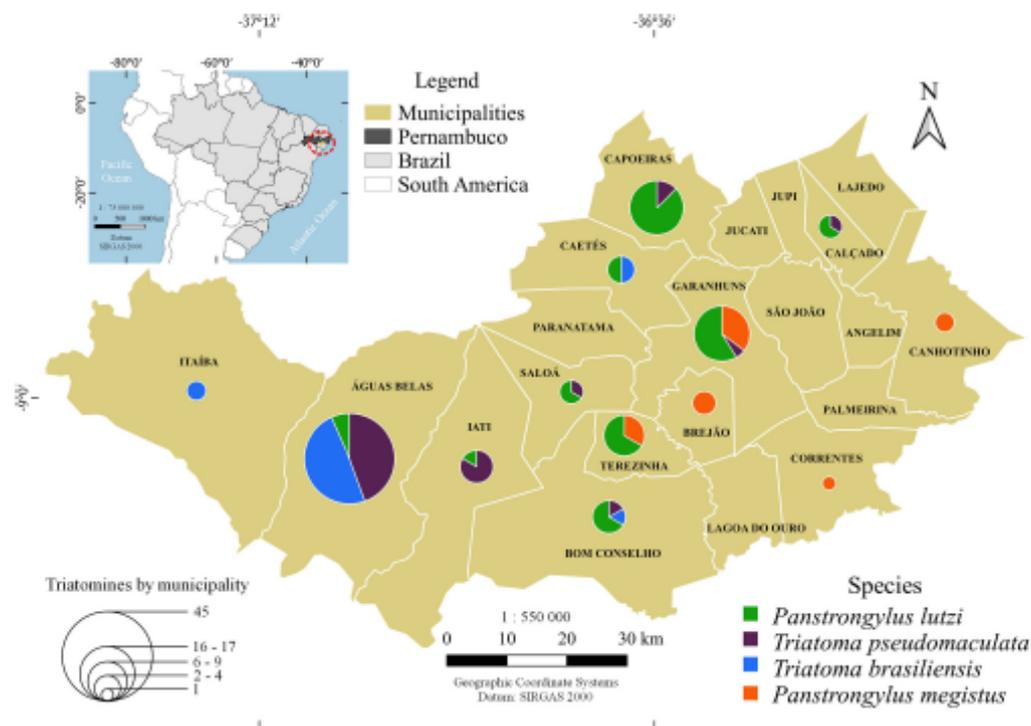


Fig. 1 Study area and distribution of species of triatomines collected in the microregion of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil

Detection of *T. cruzi* infection in triatomines

Microscopic examination

The direct parasitological detection was made by abdominal compression of each insect in 50 μ L saline solution (0.9% NaCl), that was then examined in an optical microscopic at 400 \times magnification to investigate the presence of trypanosomatid flagellates.

Molecular analysis

Triatomines were individually dissected and digestive tracts were separated for genomic DNA extraction, which was performed following a previously described protocol (Ramos et al. 2015).

DNA samples were individually tested for *Trypanosoma* spp. through Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers 18ST nF2 (5'-CAACGATGACACCCATG AATTGGGA-3') and 18ST nR3 (5'-TGCGCGACCAAT AATTGCAATAC-3'), which amplify a product of 700-800 bp of the 18S rRNA gene (Geysen et al. 2003).

Positive (DNA of *T. cruzi* from a triatomine) and negative (DNA of an uninfected triatomine) controls were used in all reactions. PCR products were subjected to electrophoresis in 1.5% agarose gel, stained with GelRedTM (Biotium) and visualized under an UV transilluminator. The amplified products were purified using ExoSAP-IT[®] (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instructions, and sequenced in both directions in an automatic sequencer ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), using the Sanger's method (Sanger et al. 1977). DNA sequences were compared with sequences from the GenBank database using the BLASTn search tool (Altschul et al. 1990).

PCR positive samples were further submitted to a multiplex PCR, based on the non-transcribed spacer of the minixon gene (Fernandes et al. 2001). For this, the set of primers TC1 (5'-ACACTTCTGTGGCGTGATCG-3'), TC2 (5'-TTGCTCGCACACTCGGCTG-CAT-3') and TC3 (5'-CCGCGWACAACCCCTMATAAAAATG-3') from the intergenic region of *T. cruzi* minixon, and a common oligonucleotide downstream from the most conserved part of the minixon gene Me (5'-TACCAATATAG

TACAGAACTG-3') were used. These primers amplify products with 200 bp (TcI), 250 bp (TcII/ TcV/TcVI) and 150 bp (TcIII/TcIV) (Fernandes et al. 2001; Aliaga et al. 2011). Positive (DNA of *T. cruzi* from a triatomine) and negative (DNA of an uninfected triatomine) controls were used in all reactions, which were also subjected to electrophoresis as previously described, but in 3% agarose gel.

Results

Out of 117 triatomines, 93.16% (109/117) were collected in intradomicile areas and 6.84% (8/117) in peridomicile areas. All insect samples were classified as adults and identified as *Panstrongylus lutzi* (37.60%; 44/117), *Triatoma pseudomaculata* (26.50%; 31/117), *Triatoma brasiliensis* (23.08%; 27/117) and *Panstrongylus megistus* (12.82%, 15/117) from 57.14% (12/21) of municipalities of the study area. The direct parasitological detection rate was 9.40% (11/117). The infection rate observed in triatomines was 13.33% (2/15) for *P. megistus*, 12.90% (4/31) for *T. pseudomaculata*, 7.41% (2/27) for *T. brasiliensis* and 6.82% (3/44) for *P. lutzi* (Neiva and Pinto 1923).

The digestive tracts of 91 specimens (34 *P. lutzi*, 30 *T. pseudomaculata*, 15 *T. brasiliensis* and 12 *P. megistus*) were molecularly analyzed because in some samples (n = 26) the material was insufficient to perform both analyses. The microscopical examination detected an overall infection rate by *T. cruzi* of 5.49% (5/91), whereas *Trypanosoma* spp. DNA was detected in 26.37% (24/91) of the samples. In particular, 26.47% (9/34) were detected in *P. lutzi*, 20.00% (6/30) in *T. pseudomaculata*, 13.33% (2/15) in *T. brasiliensis* and 58.33% (7/12) in *P. megistus*. Homologies varying from 96.5% to 99.8% were detected with *T. cruzi* sequences available at the GenBank database. The molecular assessment revealed an infection rate by *T. cruzi* of 12.09% (11/91), being 8.82% (3/34) in *P. lutzi*, 10.00% (3/30) in *T. pseudomaculata* and 41.67% (5/12) in *P. megistus*. The DNA sequences herein obtained were deposited in the GenBank under the accession numbers: MN721297, MN721298, MN721299, MN721300, MN721302, MN721303, MN721304, MN721305, MN721306, MN721308, MN721309. It is worth mentioning that the difference between the number of positive samples for PCR (24) and the number of sequences deposited in GenBank (11), was due to the quality of the sequences obtained.

Molecular typing for the minixon gene of *T. cruzi* was performed for 17 samples, in which *Trypanosoma* spp. DNA was detected. Twelve samples were classified as TcI and the remaining five were classified as DTU TcIII/TcIV (Table 1). All samples of TcI were obtained from triatomines captured from the intradomicile environment.

Most of the samples that amplified for TcIII primer (DTU TcIII/TcIV) were triatomines from intradomicile and only one sample from peridomicile environment.

Discussion

This study revealed for the first time the presence of *T. cruzi* DTUs TcI and TcIII/TcIV group in triatomine species collected from a Chagas disease endemic area in Northeastern Brazil (state of Pernambuco), with predominance of the genotype TcI strain detected exclusively in samples collected in intradomicile environment. The genotyping of *T. cruzi* based on a single genetic target had been considered a limitation of the research due to the potential influence of genetic exchange (Zingales et al. 2012). Even though, data herein presented are important and contributes to the epidemiological knowledge of *T. cruzi* genotypes in Brazil.

Different triatomine species (i.e., *P. lutzi*, *T. pseudomaculata*, *T. brasiliensis* and *P. megistus*), most of them captured in intradomicile areas, were evaluated in this study. This data is supported by the results obtained in a recent research in the Northeastern region of Brazil, which demonstrated that 94.5% of the triatomine specimens were captured in indoor environments (Silva et al. 2019). In general, species of both genera herein detected (i.e., *Panstrongylus* and *Triatoma*) are found in burrows, tree cavities, terrestrial rocky habitats and rodent lairs (Gaut and Miles 2000). However, they may search for refuge or food sources in artificial environments close to domestic animal shelters, increasing the risk of human and animal infection (Ribeiro et al. 2014; Barbosa-Silva et al. 2019).

In previous study conducted in the same area, *P. lutzi* was also the most frequent species (Silva et al. 2012). This insect has a promiscuous feeding behavior using domestic and synanthropic animals, as well as human as source of blood (Silva et al. 2017). Additionally, it presents high infection rates by *T. cruzi*, demonstrating its epidemiological importance in endemic areas for CD (Silva et al. 2012). On the other hand, *T. pseudomaculata* is found predominantly in tree trunks, and feed mainly on blood of birds. Another important species herein detected, *T. brasiliensis*, has been considered the main vector of *T. cruzi* in Northeastern Brazil. Although, this species had been predominantly associated with rodents (e.g., *Galea spixii* and *Kerodon rupestris*) (Lilioso et al. 2020; Ferreira et al. 2020), it has been proved that they may use a wide variety of blood food sources (e.g., bird, skunk, dog, goat and human) (Silva et al. 2017). The area of study is an important producer of milk in Brazil. Accordingly, the expansion of areas of bovine rearing increase the deforestation, which may be associated reduction of natural

Table 1 Triatomines examined by species and infected with different DTUs of *Trypanosoma cruzi*

| Triatomine species | DTU TcI | | DTU TcIII/TcIV | |
|--------------------------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | Positive/Total examined | RF (%) | Positive/Total examined | RF (%) |
| <i>P. megistus</i> | 4/6 | 66.67 | 2/6 | 33.33 |
| <i>P. lutzii</i> | 2/5 | 40.00 | 3/5 | 60.00 |
| <i>T. pseudomaculata</i> | 5/5 | 100.00 | 0/5 | 0.00 |
| <i>T. brasiliensis</i> | 1/1 | 100.00 | 0/1 | 0.00 |
| Total | 12/17 | 70.59 | 5/17 | 29.41 |

DTU: Discrete Typing Units / RF: Relative frequency

habitats of vectors, resulting in an intense invasion of domiciles (Parente et al. 2017; Santos et al. 2020).

The specimens herein analyzed presented infection rates by *T. cruzi* of 5.49% and 12.09% at microscopic and molecular examinations, respectively. Microscopical studies performed in other endemic areas demonstrated lower infection rates in the states of Rio Grande do Norte (2.5%) (Barbosa-Silva, 2019), Ceará (1.4%) (Fidalgo et al. 2018) and Piauí (0.8%) (Gurgel-Gonçalves et al. 2010). Similarly, a molecular investigation performed in the state of Bahia showed an infection rate of 10% (Ribeiro-Junior et al. 2019), also lower than what was observed in the present study. The higher infection rate herein detected in the molecular analyses was an expected finding, since the sensitivity of PCR is very high when compared to microscopic techniques (Dworak et al. 2017). The microscopical analysis cannot be disregarded as it is pivotal in differentiating the stages of protozoan development and consequently the metacyclogenesis rate, which is an important feature related to the dispersion ability of the parasite. Accordingly, the combination of microscopical analysis and molecular tools is advisable to increase accuracy in diagnosis and avoid false negative results (Dworak et al. 2017; Herrera et al. 2021).

The TcI genotype was predominant in all species of triatomines herein identified. It is known that this DTU is commonly found in these invertebrates (Brenière et al. 2016), being highly prevalent in anthropic environments (Lima-Oliveira et al. 2020). In Brazil, TcI has been isolated from *P. megistus* (Ribeiro et al. 2016), *Triatoma petrochiae* Pinto and Barreto, 1925 (Lima-Oliveira et al. 2020), *T. brasiliensis* (Bezerra et al. 2018; Costa et al. 2018; Liliuso et al. 2017; Lima-Oliveira et al. 2020), *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Dario et al. 2018), *Triatoma sordida* (Cominetti et al. 2014), *T. pseudomaculata*, *Rhodnius nasutus* (Brito et al. 2008) and *Rhodnius pictipes* (Xavier et al. 2014). Though detected only in single infections in this study, this genotype has been found in mixed infections with TcIV in triatomine species collected across United States, suggesting that the vectors take blood meal from

different hosts species, or from a single vertebrate host species co-infected with distinct DTUs (Curtis-Robles et al. 2018). In Brazil, TcI co-infections have been reported in *T. brasiliensis* (TcI + TcII/VI and TcI + *Trypanosoma rangeli* genotype A) (Lima-Oliveira et al. 2020); in açai samples (TcI + TcIII + TcV + TcVI) (Ferreira et al. 2018) and cardiac tissue from a fatal case of acute oral Chagas disease (TcI + TcII + TcIII + TcIV + *Trypanosoma dionisii*) (Dario et al. 2016). In experimental conditions, TcI presented the highest rate of infection in macrophages, followed by TcII and TcIII (Ribeiro et al. 2018). This demonstrates the complexity of the Chagas disease pathogenesis and the influence of the heterogeneity of different *T. cruzi* strains in the physiopathology of the disease (Ribeiro et al. 2018). Moreover, TcI has been isolated in humans presenting different clinical evolution of Chagas disease (i.e., asymptomatic, severe cardiomyopathy, and in chronic and fatal acute infections) (Abolis et al. 2011; Ramírez et al. 2010; Santana et al. 2014; Oliveira et al. 2017; Calvopina et al. 2020).

Five specimens of *Panstrongylus* spp. amplified for the primer TCIII, which is specific for DTUs (TcII and TcIV), related to the sylvatic cycle (Zingales 2018). TcIII has already been isolated from *P. lutzii* and from a chronically infected human in Brazil (Abolis et al. 2011). Although predominant in the sylvatic cycle, TcIV has already been isolated in triatomines from the domestic cycle and in humans in Venezuela (Carrasco et al. 2012) and Brazil (Monteiro et al. 2012).

Overall, the genetic diversity of *T. cruzi* is underestimated (Jansen et al. 2020) and the real importance of this knowledge has been neglected in endemic regions of Latin America. In fact, the molecular characterization of these strains is pivotal to better understand the eco-epidemiology of the infection (Brenière et al. 2016). This approach provides important information on host-parasite interactions (Ribeiro et al. 2018). However, the association of these DTUs with vertebrate hosts and different biological cycles should be carefully interpreted (Jansen et al. 2020), since it has not been possible to unequivocally associate *T. cruzi*

genotypes with any biological response variable (biome and environment) or host species (Jansen et al. 2020).

In the state of Pernambuco, Brazil, in a previous study, blood samples from patients with chronic Chagas disease presented TcII and TcVI (Rodrigues-dos-Santos et al. 2018), however, to the best of our knowledge, this is the first molecular analysis of infections and genotyping of *T. cruzi* in triatomines in the studied area, demonstrating a higher infection rate compared to the technique (microscopic examination) commonly used by the National Program of Control of Chagas Disease (PNCDCh). The detection of positive vectors inside or close to human dwellings suggests that people living in this Chagas disease endemic area have potential risks of becoming infected by *T. cruzi*. Additionally, it is an alert for the need of implementing preventive measures such as entomological surveillance to reduce the risk of human and animal infection.

Acknowledgements The authors would like to thank Adeji Maria do Carmo and Jeane Cristina O. L. Silva from the Endemic Laboratory (V Gerência Regional de Saúde) for the direct microscopic examination assistance. This article is based on the PhD thesis (Postgraduate Program in Animal Bioscience) of the first author, developed at the Federal Rural University of Pernambuco, supported by a grant fellowship from the Coordination for the Improvement of Personnel of Higher Education (CAPES).

Author's contribution Conceptualization: TRMS, RANR, Methodology: TRMS, TGR, CAAdNR, TARFL, Formal analysis and investigation: TRMS, TGR, CAAdNR, Writing—original draft preparation: TRMS, RANR, Writing—review and editing: TRMS, TGR, CAAdNR, AS, TARFL, LCA, RANR, GAdC.

Declarations

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics The Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal Rural University of Pernambuco approved all procedures herein performed (approval number 12/2019).

References

Abois NG, Araújo SM, Toledo MJO, Fernandez MA, Gomes ML (2011) *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop* 120:167–172

Aliaga C, Brenière SF, Barnabé C (2011) Further interest of minixon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infect Gen Evol* 11:1155–1158

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment 23 search tool. *J Mol Biol* 215:403–410

Barbosa-Silva AN, Câmara ACJ, Martins K, Nunes DF, Oliveira P, Azevedo FRM et al (2016) Characteristics of triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 49:57–67

Barbosa-Silva AN, Souza RCM, Diotauri L, Aguiar LMA, Câmara ACJ, Galvão LMC et al (2019) Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 52:1–8

Bezerra CM, Barbosa SE, Souza R, Barezani CP, Gürtler RE, Ramos AN Jr, et al (2018) *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. *Parasit Vectors* 11:1–14

Bezerra CM, Cavalcanti LP, Souza R, Barbosa SE, Xavier SC, Jansen AM et al (2014) Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:887–898

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C (2016) Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Neg Trop Dis* 10:1–19

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

Calvopina M, Segovia G, Cevallos W, Vicuña Y, Costales JA, Guevara A (2020) Fatal acute Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* DTU TcI, Ecuador. *BMC Infect Dis* 20:1–5

Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoiña A, Urdaneta-Morales S, Martínez C et al (2012) Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *PLoS Neg Trop Dis* 6:1–9

Cominetti MC, Coardas BG, Cunha RC, Andreati R (2014) Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:747–755

Costa AP, Ferreira JIGS, Silva RE, Tomhosolo R, Araújo AC, Guimarães MF et al (2018) *Trypanosoma cruzi* in triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 51:445–451

Curtis-Robles R, Auckland LD, Snowden KF, Hamer GL, Hamer SA (2018) Analysis of over 1500 triatomine vectors from across the US, predominantly Texas, for *Trypanosoma cruzi* infection and Discrete Typing Units. *Infect Gen Evol* 58:171–180

Dafre MA, Andrade T, Dos Santos CB, Fux B, Brandão AA, Faqueto A (2018) Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* samples derived from *Triatoma vitticeps* and *Panstrongylus geniculatus* of the Atlantic rainforest, southeast Brazil. *Parasite* 25:1–9

Dafre MA, Rodrigues MS, Barros JH, Xavier SC, D'Andrea PS, Roque AL et al (2016) Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors* 9:1–14

Dworak ES, Araújo SM, Gomes ML, Massago M, Ferreira EC, Toledo MJO (2017) Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine. *Rev Soc Bras Med Trop* 50:629–637

Fernandes O, Santos SS, Cupoulo E, Mendonga B, Deme R, Junqueira ACV et al (2001) A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 95:97–99

Ferreira ALS, Santana MA, Santos LVB, Monteiro DP, Campos JHF, Sena LLJ et al (2020) *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa and Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in rural communities in Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 62:1–8

- Ferreira RTB, Cabral ML, Martins RS, Araujo PF, Silva SA, Brito C et al (2018) Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasit Vectors* 11:1–11
- Fidalgo ASOBV, Costa AC, Silva Filho JD, Cândido DS, Freitas EC, Pereira LS et al (2018) Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 51:174–182
- Gaunt M, Miles M (2000) The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:557–565
- Geysen D, Delespau V, Geerts S (2003) PCR-RFLP using *Ssu*-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet Parasitol* 110:171–180
- Gurgel-Gonçalves R, Pereira FCA, Lima IP, Cavalcante RR (2010) Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) no Estado do Piauí, Brasil, 2008. *Rev Pan-Amaz Saude* 1:57–64
- Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A, Vietri M, Lares M, Ferrer E (2021) Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in false negative samples of collected triatomines, xenodiagnosis material, and biopsies of experimentally infected animals. *Int Microbiol* 24:141–147
- Jansen AM, Xavier S, Roque A (2020) Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Front Cell Infect Microbiol* 10:1–15
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR (2015) The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* 151:1–15
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR (2018) *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit Vectors* 11:1–25
- Lent H, Wygodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bul Am Mus Nat Hist* 163:127–520
- Lilioso M, Folly-Ramos E, Rocha FL, Rabinovich J, Capdevielle-Dulac C, Harry M et al (2017) 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? *Am J Trop Med Hyg* 96:1456–1459
- Lilioso M, Reigada C, Pires-Silva D, Fontes FVHM, Lima C, Monsalve-Lam J et al (2020) Dynamics of food sources, ecotypic distribution and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma brasiliensis* from the northeast of Brazil. *PLoS Neg Trop Dis* 14:1–18
- Lima-Oliveira TM, Fontes FVHM, Lilioso M, Pires-Silva D, Teixeira MMG, Meza JGV et al (2020) Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrochiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. *Acta Trop* 201:1–6
- Macilí A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira A, Veludo H, Maia Da Silva F et al (2009a) A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using *SSU rDNA*, cytochrome *b* and *Histone H2B* genes and genotyping based on *ITS1 rDNA*. *Parasitol* 136:641–655
- Macilí A, Valente V, Valente A, Junqueira ACV, Maia da Silva F, Nairr R et al (2009b) *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* 39:615–623
- Martins K, Andrade CM, Barbosa-Silva AN, Nascimento GB, Chiari E, Galvão LMC et al (2015) *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis* 39:68–75
- Monteiro WM, Magalhães LK, Sá AR, Gomes ML, Toledo MJ, Borges L et al (2012) *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS ONE* 7:1–9
- Oliveira TSF, Santos BN, Galdino TS, Hasselcher-Moreno AM, Bastos OMP, Sousa MA (2017) *Trypanosoma cruzi* I genotype among isolates from patients with chronic Chagas disease followed at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (FIOCRUZ, Brazil). *Rev Soc Bras Med Trop* 50:35–43
- Parente CC, Bezerra FSM, Parente PI, Dias-Neto RV, Xavier SCC, Ramos NA Jr et al (2017) Community-based entomological surveillance reveals urban foci of Chagas disease vectors in Sobral, State of Ceará, Northeastern Brazil. *PLoS ONE* 12:1–11
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA (2010) Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Neg Trop Dis* 4:1–9
- Ramírez JD, Hernández C, Montaña M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E et al (2014) First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to Tcbat genotype. *Zoon Pub Health* 61:477–479
- Ramos RAN, Campbell BE, Whittle A, Lia RP, Montarsi F, Parisi A et al (2015) Occurrence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Southern Italy. *Ticks Tick-Borne Dis* 6:234–236
- Ribeiro AR, Lima L, Almeida LA, Monteiro J, Moreno C, Nascimento JD et al (2018) Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 98:453–463
- Ribeiro AR, Mendonça VJ, Alves RT, Martínez I, Araújo RF, Mello F et al (2014) *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Saude Pub* 48:295–302
- Ribeiro AR, Oliveira RC, Cezetti Junior W, Lima L, Almeida LA, Nascimento JD et al (2016) *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. *Rev Soc Bras Med Trop* 49:183–189
- Ribeiro-Júnior G, dos Santos C, Lanza F, Reis J, Vaccarezza F, Diniz C et al (2019) Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasit Vectors* 12:1–10
- Rodrigues-dos-Santos Í, Melo MF, de Castro L, Hasselcher-Moreno AM, do Brasil PEAA, Silvestre de Sousa A et al (2018) Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 12:1–19
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci United States of America* 74:5463–5467
- Santana RA, Magalhães LK, Magalhães LK, Prestes SR, Maciel MG, Silva GA et al (2014) *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors* 7:1–7
- Santos JP, Guimarães LM, Lima IP, Batista FMA, Carvalho-Costa FA, Santos-Mallet JR (2020) Spatial distribution of synanthropic triatomines in Piauí State, Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 62:1–13
- Silva MBA, Barreto AVMS, Silva HA, Galvão C, Rocha D, Jurberg J et al (2012) 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* 45:60–65
- Silva MBA, Menezes KR, Farias MCG, Andrade MS, Victor CCA, Lorosa ES et al (2017) Description of the feeding preferences of triatominae in the Chagas disease surveillance study for the State

- of Pernambuco, Brazil (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 50:543–546
- Silva TRM, Barros GMMR, Lima TARF, Giannelli A, Silva GMda, Alves KML et al (2019) Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 52:1–5
- World Health Organization (WHO) (2021) Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> Accessed 26 June 2021
- Xavier SC, Roque AL, Bilac D, Anzijo VA, Costa Neto SF, Loroza ES et al (2014) Distant transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Neg Trop Dis* 8:1–9
- Zingales B (2018) *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* 184:38–52
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O et al (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:1051–1054
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM et al (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Gen Evol* 12:240–253

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ANEXO 3

Received: 14 July 2021 | Revised: 27 September 2021 | Accepted: 15 October 2021

DOI: 10.1111/zph.12898

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Infections by trypanosomatid (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in triatomines (Hemiptera: Triatominae): A spatiotemporal assessment in an endemic area for Chagas disease

Tatiene Rossana M^ota Silva¹  | Edyniesky Ferrer-Miranda²  |
 J^essica Cardoso Pessoa de Oliveira¹  | Kleber R^egis Santoro²  |
 Leucio C^amara Alves³  | Lⁱlian Silva Sampaio de Barros⁴ |
 Rafael Antonio Nascimento Ramos¹  | Gⁱlcia Aparecida de Carvalho¹ 

¹Laboratory of Parasitology, Federal University of the Agreste of Pernambuco, Garanhuns, Brazil

²Graduate Program in Biometrics and Applies Statistics, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

³Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁴V Regional Health Management, Health Secretariat of the State of Pernambuco, Garanhuns, Brazil

Correspondence
 Rafael Antonio Nascimento Ramos, Federal University of the Agreste of Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil.
 Email: rafael.ramos@ufape.edu.br

Abstract

This research analysed the spatiotemporal distribution of triatomines infected by trypanosomatid parasites in an endemic region for Chagas disease, in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. The database included the total number of triatomines captured from intradomicile and peridomicile areas, as well as the infection rate (IR) by trypanosomatid. The G_i^* by Getis-Ord method was used to statistically identify significant concentration clusters and the IR of triatomines by trypanosomatids. A generalized linear regression model with a binomial distribution was used to evaluate the probability of finding an IR by trypanosomatids. Overall, of 4,800 triatomines examined, trypanosomatid forms similar to *Trypanosoma cruzi* were detected in 10.29% of them, and the majority of positive specimens (98.17%) were collected at intradomicile. The geospatial analyses identified triatomines clusters in intradomicile and peridomicile environments. According to the logistic regression data for species (*Panstrongylus lutzi*, *P. megistus*, *Triatoma brasiliensis* and *T. pseudomaculata*), the probability of detection of *T. cruzi* infection remains constant in up to 50 specimens examined or more. The findings of this research revealed a scenario never studied in this area through this type of spatiotemporal analysis, which is essential to identify areas of vulnerability for the occurrence of these vectors and consequently for Chagas disease.

KEYWORDS

distribution, infection rate, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*

1 | INTRODUCTION

Triatomines (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae) are hematophagous insects of great medical importance that act as vectors of pathogens, including *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida:Trypanosomatidae), the etiological agent of Chagas disease (CD) (Lent & Wygodzinsky, 1979). This neglected anthroponosis is endemic in many areas of Latin America, where it remains as an important cause of morbidity and mortality in human populations (Machado et al., 2012).

In Brazil, it has been considered the second most important cause of mortality by parasitic infections, with approximately 55,200 deaths from 2008 to 2019 (Brasil, 2019a). Unfortunately, there is no vaccine, and the cure is dependent on factors such as the stage of the disease, the age of the patient and the susceptibility of the *T. cruzi* strains to anti-parasitic drugs. Hence, vector surveillance is an important effective strategy to prevent human infection (Dias et al., 2016; Ribeiro-Júnior et al., 2019).

The vectors occur predominantly in neotropical regions (Jurberg et al., 2017), inhabiting especially wild environments (Cominetti et al., 2014). However, recent ecological changes (e.g. deforestation, climate change and urbanization) in both rural and urban areas have altered the behaviour of these insects, which have been frequently observed close to human dwellings (i.e. intradomicile or peridomicile environments; Argolo et al., 2008; Fidalgo et al., 2018; Sarquis et al., 2012; Schmußis, 2000). Although all species of the Triatominae subfamily had been considered potential vectors of *T. cruzi*, only some of them gather specific conditions to be a good vector, such as a high degree of artificial ecotype colonization, anthropophilic behaviour and a short interval between meal and defecation (Galvão, 2014).

In Brazil, 68 species of triatomines have been registered, and 13 have been considered of epidemiological importance (*Panstrongylus geniculatus* [Latreille, 1811], *P. lutzii* [Neiva & Pinto, 1923], *P. megistus* [Burmeister, 1835], *Rhodnius nasutus* [Stål, 1859], *R. neglectus* [Lent, 1954], *R. robustus* [Larrousse, 1927], *Triatoma maculata* [Erichson, 1848], *T. pseudomaculata* [Corrêa & Espinola, 1964], *T. infestans* [Klug, 1834], *T. rubrovaria* [Blanchard, 1843], *T. brasiliensis* [Neiva, 1911], *T. sordida* [Stål, 1859] and *T. vitticeps* [Stål, 1859]; Brasil, 2019b). For a long time, the primary measure of CD control was based on vector surveillance, and after an extensive control program, the Brazil was certified as a free area from *T. cruzi* transmission by *T. infestans*. Nonetheless, other triatomine species continue to invade and colonize artificial environments perpetuating the disease in endemic regions (Abad-Franch et al., 2013). The spreading of human-inhabited areas may disturb sites where natural cycles of *T. cruzi* occur, leading triatomines to invade domiciles and also maintain synanthropic reservoirs close to human dwellings (Coura, 2007). Over time, these alterations have allowed the spread of triatomines infesting intradomicile and peridomicile areas, with infection rates (IRs) by *T. cruzi* ranging from 1.3% (Fidalgo et al., 2018) to 19.6% in some Brazilian regions (Dias et al., 2016).

The monitoring of the dynamics of vector populations able to transmit *T. cruzi* to susceptible hosts is pivotal to better know the

Impacts

- Spatiotemporal distribution of triatomines was assessed.
- *Trypanosoma cruzi* were detected in 10.29% of triatomines examined.
- Data allow the identification of areas of vulnerability for the occurrence of vectors.

potential risk areas, as well as to elucidate the proximity of these vectors to human dwellings (Barbosa-Silva et al., 2019). More recently, several statistical models have been used to analyse the spatiotemporal behaviour of vectors and their associated pathogens, generating essential data useful to the application of preventive measures against neglected diseases (Talla et al., 2014). Therefore, this study aimed to analyse the spatiotemporal distribution of triatomines and to evaluate the probability of detection of IR by trypanosomatids in these vectors.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study area, data collection and ethical aspect

The study area is located in the Northeastern region of Brazil, covering a total of 21 municipalities belonging to the health region of Garanhuns (Latitude 8°53'27"S and Longitude 36°29'48"W), state of Pernambuco (Figure S1). These municipalities are characterized by a semi-arid climate with average annual temperature of 22°C (ranging from 17°C to 30°C), rainfall mean of 147 mm (ranging from 25 to 295 mm) and air relative humidity of 90%. This area is found in an endemic region for CD, where triatomine species have been captured in intradomicile and peridomicile environments (Silva et al., 2019). Moreover, from 2001 to 2017, 68 deaths from CD were recorded in this area (Brasil, 2019b).

A retrospective study was performed using the data from 2008 to 2018, produced by the National Chagas Disease Control Program (*Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas* [PNCDCh]) and provided by the *V Gerência Regional de Saúde* of the state of Pernambuco. It is important to note that the collection of specimens did not follow a regular frequency.

Briefly, triatomine specimens were manually collected with the aid of tweezers in intradomicile (e.g. bed frames, stored objects, boxes, walls and pictures stuck on walls) and peridomicile (e.g. chicken coops, piggens, cattle sheds, piles of tiles, wood and bricks) areas. Each sampling was performed between 8 and 12 a.m. by two operators for a period of 30 min in both peridomicile and intradomicile environments. After collection, specimens were individually assessed through abdominal compression and examination of feces. The fecal content was homogenized in 50 µl of saline solution (0.9% NaCl) and visualized under an optical microscopic at different magnifications (100x and 400x). The whole slide was observed in each

analysis. Finally, the identification of the triatomine species was carried out according to Lent and Wygodzinsky (1979).

The Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal Rural University of Pernambuco approved all procedures herein performed (approval number 12/2019).

2.2 | Data analysis

The Yates-corrected chi-square test (χ^2) was used to compare the presence of triatomines positive in the intradomiciliary or peridomiciliary areas. The Kruskal-Wallis test was used to compare the triatomines collected at the different municipalities. The significance level was set at 5%. BioEstat (v. 5.3) software was used to perform the statistical analyses.

2.3 | Statistical models

The G_i^* by Getis-Ord method was used to statistically identify significant clusters of high values (hot spots) and low values (cold spots) (Fischer & Getis, 2009; Getis & Ord, 1992; Pfeiffer et al., 2008) of triatomine concentrations in intradomicile and peridomicile environments and also for the IR of triatomines positive for *T. cruzi* in each municipality. The method is based on the search for triatomine in intradomicile and peridomicile environments within neighbourhoods. In order to be a statistically significant hot spot, an observation must have a high value and be surrounded by other entities with high values (hot spots), being the same for low values (cold spots) (Pfeiffer et al., 2008). The data were grouped every 2 years, except for last year (2018), in order to facilitate its interpretation. The G_i^* is calculated as follows:

$$G_i^* = \frac{\sum_{j=1}^n W_{ij} x_j - \bar{X}_i \sum_{j=1}^n W_{ij}}{S_i \sqrt{\frac{n \sum_{j=1}^n W_{ij}^2 - (\sum_{j=1}^n W_{ij})^2}{n-1}}}, \forall j \neq i$$

Where x_j is the attribute value for the feature j (e.g. a total of triatomines examined from intradomicile and peridomicile areas and IR in each municipality), w_{ij} is the spatial weight matrix between feature i and j and n is equal to the total number of features, and

$$\bar{X}_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_j}{n}$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n x_j^2}{n} - (\bar{X}_i)^2}$$

where \bar{X}_i is the mean and S_i is the standard deviation of the attribute values in the period analysed for the feature i , respectively. This statistic creates a z-score, which denotes the significance of a specific area over its surrounding areas. Figures were created using outputs of the G_i^* method, one for the total number of triatomines examined from

intradomicile and peridomicile areas and another for the IR of triatomines infected by *T. cruzi*.

A generalized linear model with a binomial distribution (logistic regression model; Dohoo et al., 2003; Thrusfield et al., 2018) was used to evaluate the probability of detecting an IR by *T. cruzi* in triatomines, according to the number examined.

$$Y_i = \text{Binomial}(p_i, n_i).$$

Where n_i represent the number of trials (Knowles) and p_i is the probability of the events (unknown). The logistic regression model was added as a response variable the IR (r_i , $i = 0, \dots, 1$), as explanatory variables the number of triatomines evaluated (x_{1i} , $i = 1, \dots, 150$) and the species of triatomines (*P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*) identified in the study region (x_{2i} , $i = 1, \dots, 4$). The equation is represented as follows:

$$\log\left(\frac{P(r_i = 1)}{1 - P(r_i = 1)}\right) = \beta_0 + \beta_{1i} x_{1i} + \beta_{2i} x_{2i} + \epsilon_i.$$

where β_0 , β_1 and β_2 are parameters to be estimated, the linear and angular coefficients, respectively, and ϵ_i is the random error. The Wald test (Bewick et al., 2005; Perdue & Seal, 2000) was applied to evaluate the significant difference that exists between species of triatomines ($\alpha \leq 0.05$). Furthermore, a graph was constructed from logistic regression, showing the mean probability of finding a given IR for *P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* concerning the number of triatomines evaluated.

All analyses were performed using the statistical program R-3.6.1 (R Core Team, 2019), with the following packages: Tidyverse (Wickham, 2017), sf (Pebesma, 2018), spdep (Bivand & Wong, 2018), Stats (R Core Team, 2019) and aod (Lesnoff & Lancelot, 2012).

3 | RESULTS

Overall, of 4,800 triatomines collected and examined, trypanosomatid forms suggestive of *T. cruzi* were detected in 10.29% (494/4,800). Out of all positive insects, 98.17% (485/494) were collected in intradomicile environments, whereas 1.83% (9/494) were collected in peridomicile areas ($\chi^2 = 456.731$; $p < .0001$). Trypanosomatid forms similar to *T. cruzi* were detected in triatomines of the genera *Panstrongylus* (Berg, 1879) and *Triatoma* (Laporte, 1832) (Table 1). Raw data of number of specimens collected in each municipality at intradomicile and peridomicile areas are available in Table S1.

3.1 | Data analysis

The database included triatomine positives from intradomicile and peridomicile areas in each municipality. The identification of trypanosomatid forms was achieved using morphological features previously described (Souza, 1999). Briefly, they were characterized by

TABLE 1 Triatomines examined and infection rate by trypanosomatid forms from intradomicile and peridomicile areas during the whole study period (2008–2018)

| Species | Intradomicile area | | | Peridomicile area | | | Total | | |
|------------------------------|--------------------|----------|--------|-------------------|----------|--------|----------|----------|--------|
| | Examined | Positive | IR (%) | Examined | Positive | IR (%) | Examined | Positive | IR (%) |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | 1 | 1 | 100.00 | 0 | 0 | 0.00 | 1 | 1 | 100.00 |
| <i>P. megistus</i> | 884 | 128 | 14.48 | 82 | 2 | 2.44 | 966 | 130 | 13.46 |
| <i>T. melanocephala</i> | 8 | 1 | 12.50 | 0 | 0 | 0.00 | 8 | 1 | 12.50 |
| <i>T. pseudomaculata</i> | 993 | 105 | 10.57 | 71 | 3 | 4.23 | 1,064 | 108 | 10.15 |
| <i>P. lutzii</i> | 1,461 | 149 | 10.20 | 36 | 0 | 0.00 | 1,497 | 149 | 9.95 |
| <i>Triatoma</i> spp. | 11 | 1 | 9.09 | 0 | 0 | 0.00 | 11 | 1 | 9.09 |
| <i>Triatoma brasiliensis</i> | 1,183 | 100 | 8.45 | 64 | 4 | 6.25 | 1,247 | 104 | 8.34 |
| <i>T. infestans</i> | 0 | 0 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 |
| <i>Panstrongylus</i> sp. | 0 | 0 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 |
| <i>Rhodnius</i> spp. | 4 | 0 | 0.00 | 0 | 0 | 0.00 | 4 | 0 | 0.00 |
| Total | 4,545 | 485 | 10.67 | 255 | 9 | 3.53 | 4,800 | 494 | 10.29 |

Abbreviation: IR, infection rate.

the presence of flagellum, undulating membrane and the kinetoplast located close to the nucleus. Triatomines positive for *T. cruzi* were detected in 90.48% (19/21) of the municipalities studied. Overall, Águas Belas and Iati presented the highest number of positive specimens collected at intradomicile and peridomicile areas. No statistical difference was observed between both areas cited previously ($p > .05$), but they differ statistically of all other municipalities ($p < .05$). The IR was higher in the municipalities of Jupi and Calçado (Table S2).

The triatomine species most frequently infected included *P. megistus*, *T. pseudomaculata*, *P. lutzii* and *T. brasiliensis*. Figure 1 illustrates the number of triatomines captured and examined per year for the four species (i.e. *P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*) statistically significant. During the whole study period (2008–2018), an apparent gradual reduction in the number of bugs collected and IRs were observed (Figure 1).

3.2 | Geostatistical analysis

The geospatial analyses enabled the identification of hot and cold spots for triatomines examined from intradomicile areas into six periods (2008–2009 up to 2018). In particular, in the intradomicile area, hot spots were identified in Águas Belas, and cold spots were identified in Garanhuns during the entire study (from 2008 to 2018). Figure 2 illustrates hot and cold spots for triatomines examined in intradomicile areas for all municipalities during the whole study period.

For triatomines examined in peridomicile areas, hot spots were identified in Águas Belas during 2008–2009, 2010–2011, 2014–2015 and 2016–2017 and in Itaíba during 2008–2009. Conversely, cold spots were identified in Garanhuns from 2008–2009 to 2016–2017. Figure 3 illustrates hot and cold spots for triatomines examined in peridomicile areas for all municipalities during the whole study period.

For the IR, geospatial analyses identified that data were homogeneously distributed and did not form clusters. However, hot spots were identified in Canhotinho during 2008–2009 and 2012–2013, whereas cold spots were detected in Caetés from 2008 to 2018 and in Jucati during 2018 (Figure 4).

3.3 | Logistic regression

According to the logistic regression by species (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*), the probability of *T. cruzi* infection remains constant in examinations with 50 specimens or more (Figure 5).

4 | DISCUSSION

This study reports the spatiotemporal behaviour of triatomines infected with trypanosomatid forms similar to *T. cruzi*, collected at intradomicile and peridomicile areas of an endemic region for CD in Northeastern Brazil. The overall IR herein obtained (10.29%) is similar to that previously reported (10%) in the state of Pernambuco (Silva et al., 2017). Most of the infected triatomines were collected in intradomicile areas, demonstrating the synanthropic behaviour of these vectors (Silva et al., 2017). This finding indicates an alarming scenario considering that the proximity of these vectors to human dwellings is one of the main risk factors for *T. cruzi* transmission (Fidalgo et al., 2018; Ribeiro et al., 2014).

It is important to note that more than 90% of triatomine examined were collected at intradomicile, consequently almost all positive trypanosomatid species (98.17%) were detected in this site. The high number of species collected at intradomicile may also be related to their attraction by light sources (e.g. lamps) facilitating the establishment of new colonies in indoor environments (Carbajal de la Fuente

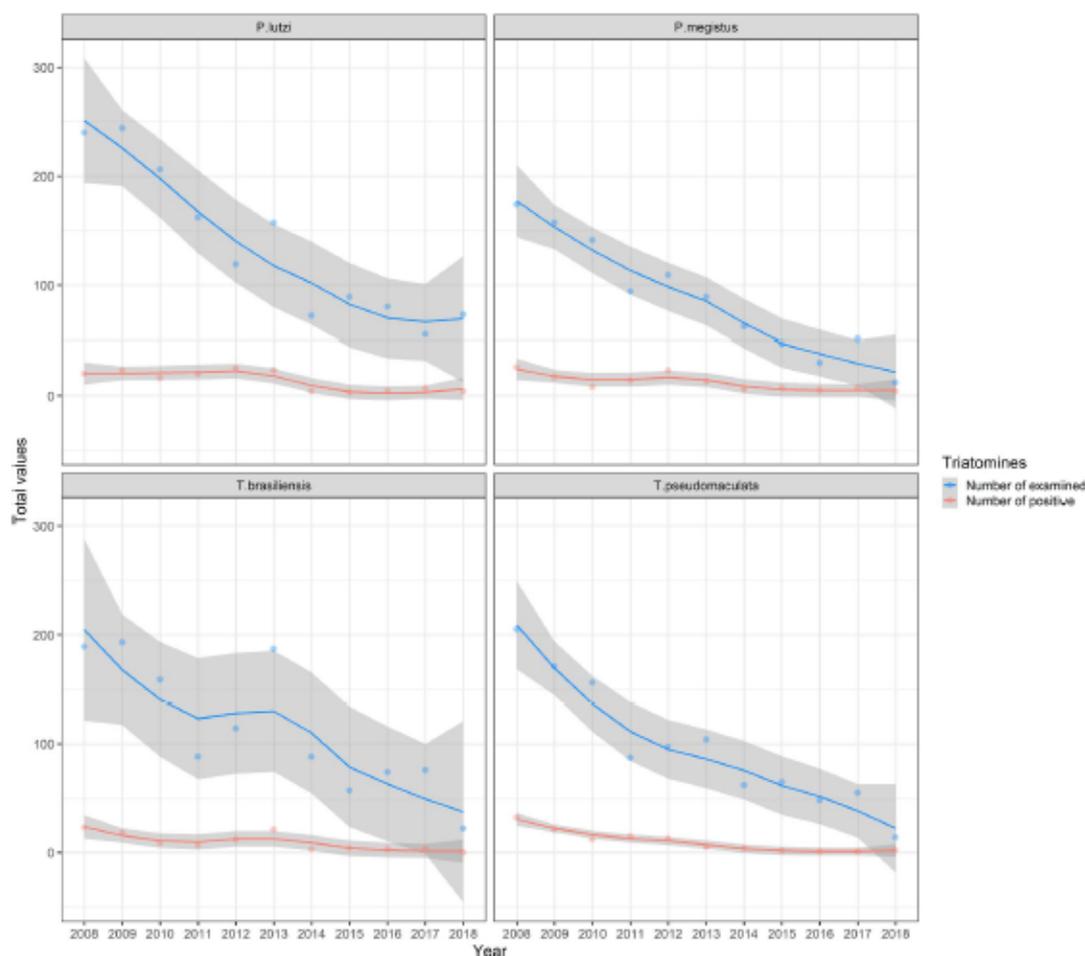


FIGURE 1 The number of triatomines examined and captured per year (2008–2018). The points represent the observed values per year (total triatomines examined and positive). The data were divided into four windows, one for each species analysed (*Panstrongylus lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*). The confidence interval (95%) (in grey) is also shown for the total triatomines examined and positive

et al., 2007). Conversely, at peridomicile, the abundance of shelters may be difficult for the retrieval of these insects during the active searching. Additionally, the method of capture (active search) employed by the program of entomological surveillance presents low sensitivity, and the number of specimens captured may vary widely depending on the vector density and characteristics of the ecotope (Abad-Franch et al., 2014).

The triatomine fauna of the region was assessed in 2012, and four species (*P. lutzii*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus* and *T. brasiliensis*) were recorded (Silva et al., 2012). Recently, this list has been updated, and other species (*T. melanocephala* [Neiva & Pinto, 1923], *T. infestans* and *Rhodnius* spp.) have been added (Silva et al., 2019). Despite the time span between both studies and the increase of

the diversity of specimens, it is clear that the most common triatomines in this area are those epidemiologically important for *T. cruzi* transmission.

Individuals belonging to the *Panstrongylus* (Berg, 1879) and *Triatoma* (Laporte, 1832) genera scored positive for trypanosomatid forms similar to *T. cruzi*. Although they present different ecological features, their potential role as a vector cannot be neglected. For example, *P. megistus* is the most important vector of *T. cruzi* in many Brazilian regions (Dias et al., 2016) and is associated with both intradomicile and peridomicile areas (e.g. animal dens, palm trees and tree holes; Jurberg et al., 2017; Santos Júnior et al., 2011). The capacity to invade and colonize domiciles and the high *T. cruzi* IR indicate that this species is of great

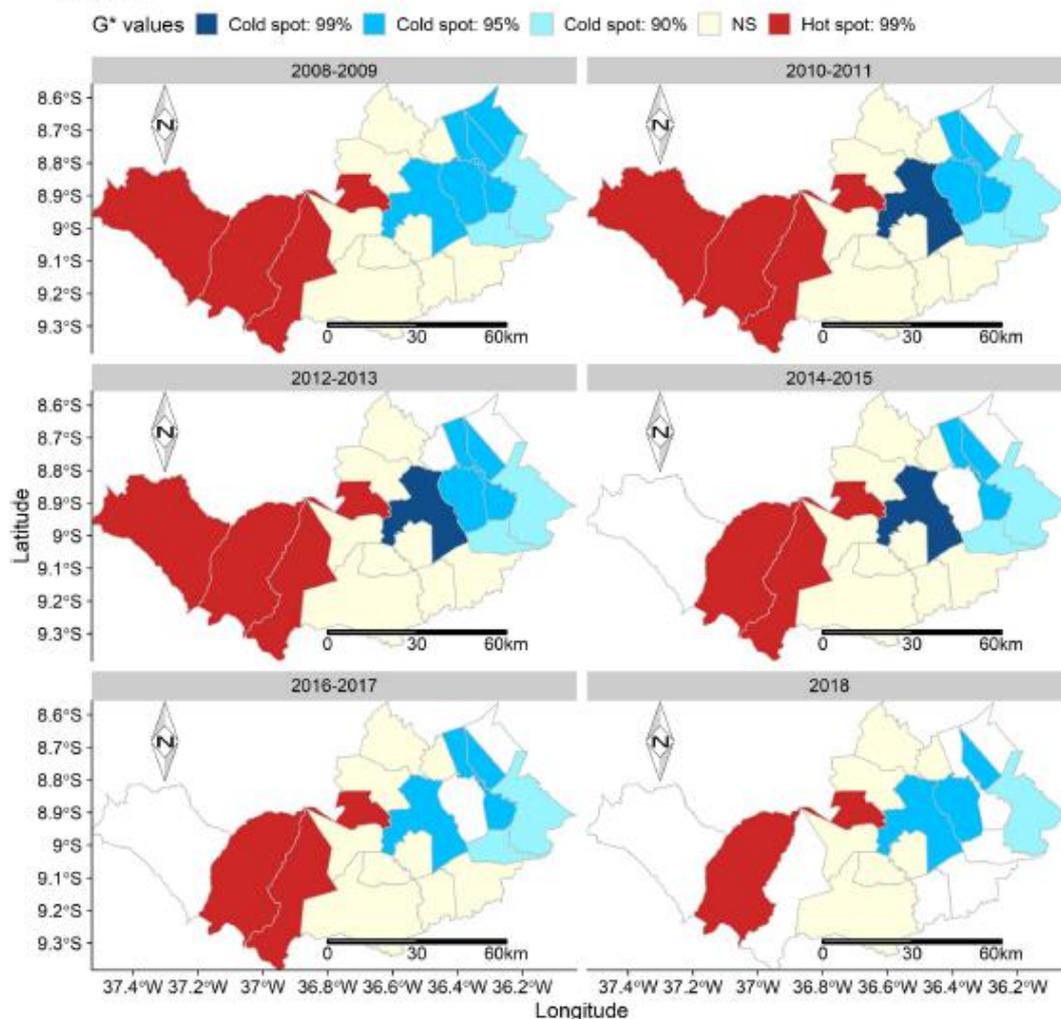


FIGURE 2 Hot and cold spots for triatomines examined from intradomicile areas in each municipality. Areas in white correspond to municipalities from which data were not available

epidemiological importance in Brazil after the control of *T. infestans* (Gurgel-Gonçalves et al., 2012).

Although *P. lutzii* had been considered a secondary species for epidemiological surveillance, it exhibits high rates of natural infection and a great capacity for domicile invasion; therefore, its importance as vector cannot be underestimated (Fidalgo et al., 2018). On the other hand, *T. brasiliensis* is one of the most important species because of its wide distribution in the caatinga biome of the Northeastern region (Silva et al., 2017). It is important to note that the promiscuous feeding behaviour of this species facilitates the circulation of *T. cruzi* between anthropic and wild environments (Daflon-Teixeira et al., 2019).

The ecological features of some triatomine species have been well studied; however, attention should also be paid to those considered less epidemiologically important, such as *T. pseudomaculata*. Although, this species has presented low infection and metacylogenesis rates for *T. cruzi* (Fidalgo et al., 2018; Perlowagora-Szumlewicz & Moreira, 1994), its preference for dwellings such as hollows, the bark of trees and chicken coops facilitates the invasion of intradomicile areas, which may raise the risk of *T. cruzi* transmission (Barbosa-Silva et al., 2016).

The apparent gradual reduction in the number of insects collected (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*) during the whole study period may have been influenced by the success of the

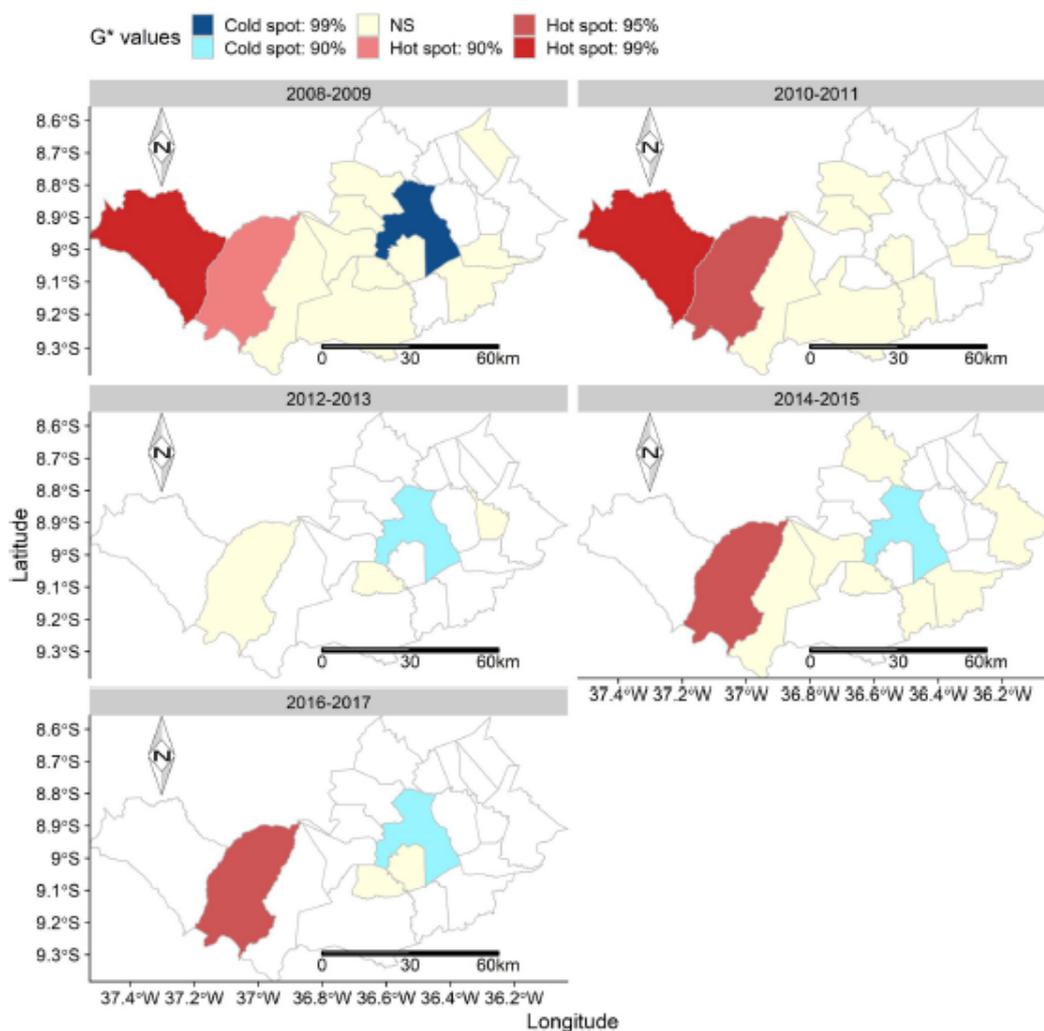


FIGURE 3 Hot and cold spots for triatomines examined from peridomicile areas in each municipality. Areas in white correspond to municipalities from which data were not available

control program and evident improvement in the sanitary conditions of the population living in this area (Fidalgo et al., 2018). Although important, the finding of the apparent gradual reduction needs to be interpreted with caution, especially because the sampling efforts among years may have influenced our results. On the other hand, the reduction in IR most likely is related to the number of specimens examined, in which it has been demonstrated that up to 50 analyses are enough to provide a reliable value of IR.

Findings of the spatiotemporal assessment revealed the presence of hot and cold spots for triatomines examined in intradomicile and peridomicile areas. It is important to highlight the municipality

of Águas Belas as a hot spot and the municipality of Garanhuns as a cold spot during the whole study. Areas of these municipalities are part of the caatinga biome and present ecological attributes that are favourable to the maintenance of triatomine species (Gurgel-Gonçalves et al., 2012). Hence, this difference may be related to the execution of the activities by the surveillance control program. Unfortunately, the no regular frequency of collection of specimens hampered a more accurate temporal analysis of data.

Regarding IR, a hot spot was identified in the municipality of Canhotinho during two periods (2008–2009 and 2012–2013), indicating that, although minimal, considering the number of specimens

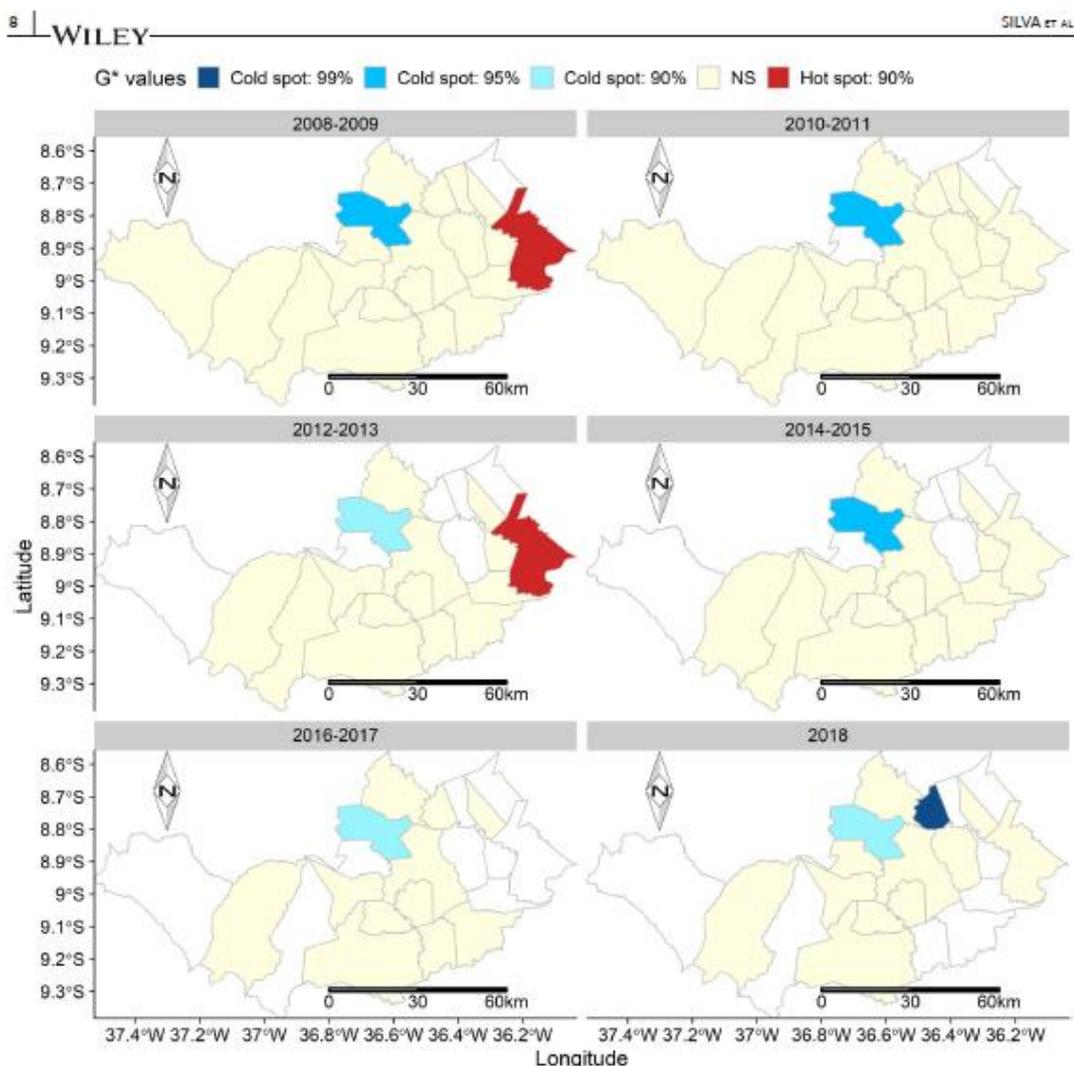


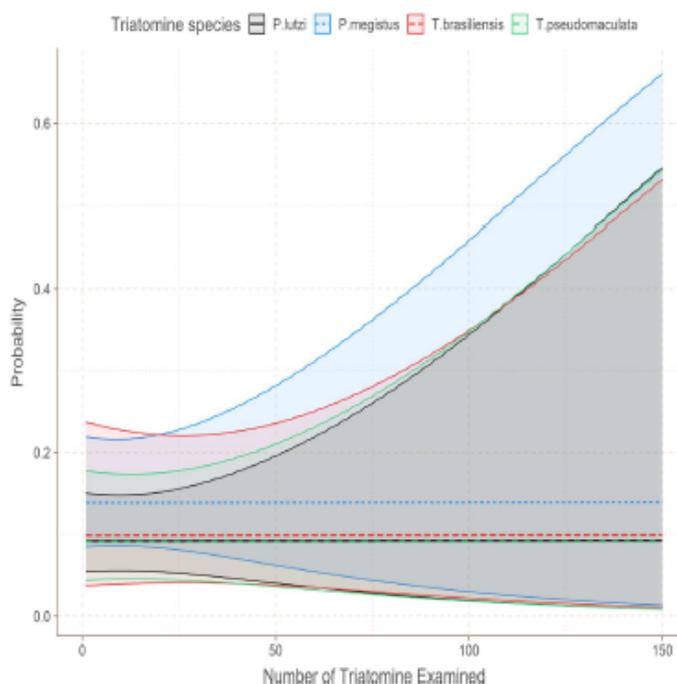
FIGURE 4 Hot and cold spots for the infection rate of triatomines examined in each municipality. Areas in white correspond to municipalities from which data were not available

collected, the risk of human infection still exists. On the other hand, the identification of cold spots in Caetés (from 2008 to 2018) and Jucati during 2018 suggests that the risk of infection in these areas was lower over this period. Although, geospatial analyses did not form clusters, for the IR, the entomological surveillance activities need to be continuous and systematic to prevent the transmission of *T. cruzi* (Barbosa-Silva et al., 2019), because positive triatomines were detected in 90.48% of the municipalities studied. It is important to note that hot spots for specimens collected did not corroborate with hot spots for IR. Considering that the number of specimens collected does not influence the probability of infection, these differences herein reported might be related to epidemiological conditions (e.g.

intensity of anthropic action, capacity of domiciliation and colonization of each species) that allow the circulation of *T. cruzi* in these insects, as well as in putative vertebrate hosts.

It is also known that IR may be influenced by the diagnostic technique employed by surveillance control program. Microscopic examination of the digestive tract of insects presents limited sensitivity in samples with low number of trypanosomatid forms. Additionally, it does not allow the differentiation of parasite stages, as well as the proper identification of trypanosomatid forms of *T. cruzi* (Moreira et al., 2017). Although the microscopical examination had been considered an important tool to assess the IR in surveillance control programs, the use of more sensitive molecular techniques (e.g.

FIGURE 5 Probability of a triatomine species to be infected by *Triatoma cruzi* concerning the sample size examined. The uncertainty of 95% regarding the probability values found is also provided in the same colour for each species



PCR) may increase the detection of infected insects that may contribute to the implementation of measures of prevention against CD (Cominetti et al., 2013).

Previous research conducted in the same area revealed a wide range of vertebrate hosts (e.g. birds, rodents, dogs, goats and humans) used as blood source for triatomines (Silva et al., 2017). For instance, domestic birds, traditionally reared on backyards by the local population, play an important role in the maintenance of triatomine colonies as they are used as meal. Similarly, rodents and marsupials, natural hosts of *T. cruzi* (Bezerra-Santos et al., 2021; Jansen et al., 2018, 2020), have been also identified as important source of blood for some triatomine species detected in this study such as *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus* and *P. lutzii* (Silva et al., 2017). Considering that climatic conditions of all municipalities herein studied do not differ, most likely the diversity of vertebrate hosts in these areas may contribute to the variation of IR according to the triatomine species.

The analysis of logistic regression performed with some species (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata*) demonstrated that the probability of infection by trypanosomatid forms similar to *T. cruzi* remains constant in examinations with 50 specimens or more. This finding is remarkable, considering that it allows a reduction of the operational costs and time, contributing to the sustainability of PNCDCh activities because the assessment of 50 specimens provides a reliable IR value.

It is important to highlight that this geographical area, where the study was conducted, had also been identified as one of the 10

hot spots of neglected tropical diseases in the world (Hotez, 2014). The differences in behaviour (intradomicile and peridomicile areas) and distribution of triatomine species in regions endemic for CD are explained by the ecology of each micro-region, by the type and intensity of anthropic action and by the capacity of domiciliation and colonization of each species, which defines its epidemiological importance concerning CD (Dias et al., 2000).

Our findings provide a scenario never studied in this area through this type of spatiotemporal analysis. The identification of these hot spots over time is pivotal to better understand the eco-epidemiology of triatomines and their associated pathogens. These data will be useful for the identification of areas of vulnerability for triatomines infected with *T. cruzi* and, consequently, a higher risk of CD, encouraging the adoption of preventive strategies against these vectors. Finally, the apparent reduction in the number of specimens collected and IR may indicate an improvement in the surveillance local service, as well as in the sanitary conditions in which the human population resides.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Maria de Lourdes Rodrigues (V Gerência Regional de Saúde) for providing the data herein used. This article is based on the PhD thesis (Postgraduate Program in Animal Bioscience) of the first author, developed at the Federal Rural University of Pernambuco and supported by a grant fellowship from the Coordination for the Improvement of Personnel of Higher Education (CAPES).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

ORCID

Tatiane Rossana Mota Silva  <https://orcid.org/0000-0002-6297-4842>

Edyniesky Ferrer-Miranda  <https://orcid.org/0000-0002-9655-8724>

Jéssica Cardoso Pessoa de Oliveira  <https://orcid.org/0000-0002-9728-1405>

Kleber Régis Santoro  <https://orcid.org/0000-0002-7592-8423>

Leucio Câmara Alves  <https://orcid.org/0000-0003-3417-5143>

Rafael Antonio Nascimento Ramos  <https://orcid.org/0000-0002-0347-9358>

Gilcia Aparecida de Carvalho  <https://orcid.org/0000-0003-2197-9759>

Gilcia Aparecida de Carvalho  <https://orcid.org/0000-0003-2197-9759>

Gilcia Aparecida de Carvalho  <https://orcid.org/0000-0003-2197-9759>

Gilcia Aparecida de Carvalho  <https://orcid.org/0000-0003-2197-9759>

REFERENCES

- Abad-Franch, F., Diotaiuti, L., Gurgel-Goncalves, R., & Gurtler, R. E. (2013). Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: Cui bono? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 251–254. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013022>
- Abad-Franch, F., Valença-Barbosa, C., Sarquis, O., & Lima, M. M. (2014). All that glitters is not gold: Sampling-process uncertainty in disease-vector surveys with false-negative and false-positive detections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3187. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003187>
- Argolo, A. M., Félix, M., Pacheco, R., & Costa, J. (2008). *Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil, Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio/Fundação Oswaldo Cruz/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.*
- Barbosa-Silva, A. N., da Câmara, A. C. J., Martins, K., Nunes, D. F., Oliveira, P. I. C., Azevedo, P. R. M., Chiari, E., & Galvão, L. M. C. (2016). 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*, 49, 57–67. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0300-2015>
- Barbosa-Silva, A. N., Souza, R. D. C. M. D., Diotaiuti, L., Aguiar, L. M. A., Câmara, A. C. J. D., Galvão, L. M. D. C., & Chiari, E. (2019). Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 52, 1–8. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0061-2019>
- Bewick, V., Cheek, L., & Ball, J. (2005). Statistics review 14: Logistic regression. *Critical Care*, 9, 112–118. <https://doi.org/10.1186/cc3045>
- Bezerra-Santos, M. A., Ramos, R. A. N., Campos, A. K., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2021). *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07072-4>. Epub ahead of print. PMID: 3378802.
- Bivand, R. S., & Wong, D. W. S. (2018). Comparing implementations of global and local indicators of spatial association. *TEST*, 27, 716–748. <https://doi.org/10.1007/s11749-018-0599-x>
- Brasil. (2019a). Ministério da Saúde. DATASUS – Tabnet. Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM: Mortalidade – Brasil. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
- Brasil. (2019b). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. 50, 1–10.
- Carbajal de la Fuente, A. L., Minoli, S. A., Lopes, C. M., Noireau, F., Lazzari, C. R., & Lorenzo, M. G. (2007). Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 101, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.12.007>
- Carlos Pinto Dias, J., Novaes Ramos, A., Dias Gontijo, E., Luquetti, A., Aparecida Shikanai-Yasuda, M., Rodrigues Coura, J., Morais Torres, R., Renan da Cunha Melo, J., Antonio de Almeida, E., de Oliveira Jr, W., Carlos Silveira, A., Marcondes de Rezende, J., Scalabrini Pinto, F., Walter Ferreira, A., Rassi, A., Augusto Fragata Filho, A., Silvestre de Sousa, A., Correia Filho, D., Maria Jansen, A., ... Vieira Alves, R. (2016). II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços De Saúde*, 25, 7–86. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>
- Cominetti, M. C., Almeida, R. F. C., Gonçalves, G. M. A., & Andreotti, R. (2013). Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 46, 277–280. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0024-2013>
- Cominetti, M. C., Csordas, B. G., Cunha, R. C., & Andreotti, R. (2014). Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 47, 747–755. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0234-2014>
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: What is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 113–122. <https://doi.org/10.1590/S0074-027620070009000018>
- Dafilon-Teixeira, N. F., Coutinho, C., Gomes, T. F., Toma, H. K., Duarte, R., Boia, M. N., Carvalho-Costa, F. A., Almeida, C. E., & Lima, M. M. (2019). Multiple approaches to address potential risk factors of Chagas disease transmission in northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 296–302. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0480>
- Dias, J. C. P., Machado, E. M. M., Fernandes, A. L., & Vinhaes, M. C. (2000). Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cadernos De Saúde Pública*, 16, 13–34. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2000008000003>
- Dias, J. V. L., Queiroz, D. R. M., Martins, H. R., Gorla, D. E., Pires, H. H. R., & Diotaiuti, L. (2016). Spatial distribution of triatomines in domiciles of an urban area of the Brazilian Southeast Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111, 43–50. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150352>
- Dohoo, I., Martin, W., & Stryhn, H. (2003). *Veterinary epidemiologic research* (S. M. McPike, Ed.). Transcontinental Prince, AVC Inc.
- dos Santos Júnior, J. E., Diotaiuti, L., & Dias, J. C. P. (2011). First report of *Panstrongylus megistus* sylvatic focus in municipality of Bambuí, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 510–513. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400022>
- Fidalgo, A. S. O. B. V., da Costa, A. C., Silva Filho, J. D., Candido, D. S., Freitas, E. C., Pereira, L. S., Andrade, M. C., Gomes, K. C. M. S., Bezerra, C. M., & Oliveira, M. F. (2018). Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 51, 174–182. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0408-2017>
- Fischer, M. M., & Getis, A. (2009). *Handbook of applied spatial analysis: Software tools, methods and applications*. Springer Science & Business Media.
- Galvão, C. (2014). *Vetores da doença de chagas no Brasil*. Sociedade Brasileira de Zoologia.

- Getis, A., & Ord, J. K. (1992). The analysis of spatial association by use of distance statistics. *Geographical Analysis*, 24, 189–206. <https://doi.org/10.1111/j.1538-4632.1992.tb00261.x>
- Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J., & Peterson, A. T. (2012). Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/705326>
- Hotez, P. J. (2014). Ten global “hotspots” for the neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2496. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002496>
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. C., & Roque, A. L. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11, 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. C., & Roque, A. L. R. (2020). Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00010>
- Jurberg, J., Rodrigues, J. M. S., Dale, C., Lamas, V. D. Jr, Peixoto, S. R., Silva, J. V. T., & Rocha, G. D. S. (2017). *Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas)*. Instituto Oswaldo Cruz.
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163, 127–520.
- Lesnoff, M., & Lancelot, R. (2012). Analysis of overdispersed data (Version R package version 1.3.1). <http://cran.r-project.org/package=ad>
- Machado, F. S., & Tanowitz, H. B. (2012). 86 - Chagas disease. In E. C. Jong, D. L. Stevens, & F. H. Netter (Eds.), *Netter's infectious diseases* (pp. 522–526). Elsevier/Saunders.
- Moreira, O. C., Verly, T., Finamore-Araújo, P., Gomes, S. A. O., Lopes, C. M., Sousa, D. M., Azevedo, L. R., Mota, F. F., d'Ávila-Levy, C. M., Santos-Mallet, J. R., & Britto, C. (2017). Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasites & Vectors*, 10, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2343-x>
- Pebesma, E. (2018). Simple features for R: Standardized support for spatial vector data. *The R Journal*, 10, 439–446. <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009>
- Perdue, M. L., & Seal, B. S. (2000). 15 - Impact of Avian viruses. In J. N. Christon (Ed.), *Viral ecology* (pp. 549–592). Academic Press.
- Perlowagora-Szumlewiec, A., & Moreira, C. J. D. C. (1994). In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*-1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 603–618. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000400018>
- Pfeiffer, D., Robinson, T. P., Stevenson, M., Stevens, K. B., Rogers, D. J., & Clements, A. C. (2008). *Spatial analysis in epidemiology I*. Oxford University Press, Oxford.
- R Core Team (2019). R Core Team (Version 3.6). <https://www.R-project.org/>
- Ribeiro, A. R., Mendonça, V. J., Alves, R. T., Martinez, I., Araújo, R. F., Mello, F., & Rosa, J. A. (2014). *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista De Saúde Pública*, 48, 295–302. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004719>
- Ribeiro-Júnior, G., Dos Santos, C., Lanza, F., Reis, J., Vaccarezza, F., Diniz, C., Miranda, D. L. P., Araújo, R. F., Cunha, G. M., Carvalho, C. M. M., Fonseca, E. O. L., Santos, R. F., Sousa, O. M. F., Reis, R. B., Araújo, W. N., Gugel-Gonçalves, R., & Reis, M. G. (2019). Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasites & Vectors*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3849-1>
- Sarquis, O., Carvalho-Costa, F. A., Toma, H. K., Georg, I., Burgoa, M. R., & Lima, M. M. (2012). Eco-epidemiology of Chagas disease in north-eastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitology Research*, 110, 1481–1485. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2651-6>
- Schmuñis, G. A. (2000). A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública da América. In Z. Brener, Z. Andrade, & M. Barral-Netto (Eds.), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (pp. 84–98). Guanabara Koogan.
- Silva, M. B. A., Barreto, A. V. M. S., Silva, H. A., Galvão, C., Rocha, D., Juberg, J., & Gurgel-Gonçalves, R. (2012). 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*, 45, 60–65. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012001000012>
- Silva, M. B. A., Menezes, K. R., Farias, M. C. G., Andrade, M. S., Victor, C. C. A., Lorosa, E. S., & Juberg, J. (2017). 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*, 50, 543–546. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0334-2016>
- Silva, T. R. M., Barros, G. M. M. R., Lima, T. A. R. F., Giannelli, A., Silva, G. M., Alves, K. M. L., Carvalho, G. A., & Ramos, R. A. N. (2019). Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 52, 1–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0278-2019>
- Souza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 17–36. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700003>
- Talla, C., Diallo, D., Dia, I., Ba, Y., Ndione, J. A., Sall, A. A., Morse, A., Diop, A., & Diallo, M. (2014). Statistical modeling of the abundance of vectors of West African Rift Valley fever in Barkedji. *Senegal. PLoS One*, 9, e114047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114047>
- Thrusfield, M., Christley, R., & Brown, H. (2018). *Veterinary epidemiology*. John Wiley & Sons Inc.
- Wickham, H. (2017). tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse' (Version version 1.2.1). cran.r-project. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Silva, T. R. M., Ferrer-Miranda, E., de Oliveira, J. C. P., Santoro, K. R., Alves, L. C., de Barros, L. S. S., Ramos, R. A. N., & de Carvalho, G. A. (2021). Infections by trypanosomatid (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in triatomines (Hemiptera: Triatominae): A spatiotemporal assessment in an endemic area for Chagas disease. *Zoonoses and Public Health*, 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/zph.12898>