

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DE FLAGELADOS DO
GÊNERO *Trypanosoma*, GRUBY 1843, EM CÃES
DOMÉSTICOS (*Canis familiares*) NO MUNICÍPIO
DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2009

CARACTERIZAÇÃO DE FLAGELADOS DO GÊNERO
Trypanosoma, GRUBY1843, EM CÃES
DOMÉSTICOS (*Canis familiares*) NO MUNICÍPIO DO
RIO DE JANEIRO

ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA PINTO

Dissertação apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientado por Dra. Maria de Fátima Madeira e Dra. Tânia Maria Valente Pacheco.

Rio de Janeiro

2009

Ficha catalográfica

Pinto, Andressa Guimarães de Souza

Caracterização de flagelados do gênero *Trypanosoma*, Gruby 1843, em cães domésticos (*Canis familiares*) no município do Rio de Janeiro. PINTO, ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA, 2009

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA
EVANDRO CHAGAS, PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS 2008
BIBLIOTECA 00F

ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA PINTO

CARACTERIZAÇÃO DE FLAGELADOS DO GÊNERO
Trypanosoma, GRUBY1843, EM CÃES
DOMÉSTICOS (*Canis familiares*) NO MUNICÍPIO DO
RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra Maria de Fátima Madeira

Dra Tânia Maria Valente Pacheco

Aprovado em __ / __ / __.

Banca examinadora

Dra Fátima Conceição Silva (Presidente) IOC/ Fiocruz

Dra Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (componente) UFRRJ

Dr Fabiano Borges Figueiredo (componente) IPEC/ Fiocruz

Dra Aline Fagundes (suplente) IPEC/ Fiocruz

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Fátima, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de laboratório, pelos ensinamentos durante toda essa fase, pela dedicação e apoio na construção, desenvolvimento e finalização desta dissertação.

À minha orientadora Dra. Tânia pela oportunidade de ingressar nesta Instituição, sem a qual eu não teria começado este trabalho e por todo apoio durante o mestrado.

Aos amigos do LAPCLIN-DERMZOO, em especial ao Fabiano, Sandro e Leandra por toda amizade, ensinamentos e paciência durante toda época de estágio e para concretização deste trabalho.

À Dra Fátima Conceição pela oportunidade de crescimento profissional em seu laboratório e por todos os ensinamentos enquanto sua estagiária.

A todos os colaboradores em especial Dra Aline, Ms Eliame pelos ensinamentos das técnicas.

A toda equipe de laboratórios, em especial as amigas Cibele, Luanda, Juliana, Cíntia Mello, Cris, Cíntia de Paula, Alessandra e Célia pelo apoio na bancada e companheirismo.

À coordenação de Pós-graduação, em especial ao Marcelo e Susy.

Aos professores do curso e a todos os amigos de turma.

À minha família pelo apoio e amor dedicados sempre.

Aos proprietários que participaram deste estudo juntamente com seus animais de forma a construir os resultados desse trabalho.

Pinto, A. G. S. **Caracterização de flagelados do gênero *Trypanosoma*, Gruby 1843, em cães domésticos (*Canis familiares*) no município do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2009. f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

O envolvimento do cão doméstico com diferentes membros da família Trypanosomatidae tem sido foco de inúmeros estudos, principalmente pela relação de proximidade que este animal possui com o ser humano. Recentemente foi descrito, no município do Rio de Janeiro, uma nova espécie do gênero *Trypanosoma* (*T. caninum*) infectando esse animal. A princípio, acreditou-se tratar-se de um achado ocasional, entretanto, outros isolados, similares à espécie inicialmente descrita, foram posteriormente obtidos de outros 20 animais. Este estudo objetivou a identificação de 19 novos isolados do gênero *Trypanosoma*, além da avaliação dos animais e do seu ambiente. Todas as amostras foram isoladas a partir de cultivo de pele íntegra e analisadas morfológicamente, por ensaios bioquímicos através da eletroforese de isoenzimas e moleculares por PCR, utilizando primers D75/76 (genérico para família Trypanosomatidae); primers D71/72 e 121/122 (específico para *T. cruzi*) e primers R1/R2 (específico para *T. rangeli*). Os animais foram avaliados quanto à presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. através da IFI e, avaliados pela hemocultura e xenodiagnóstico. Através das ferramentas aplicadas neste estudo, todas as 19 amostras de parasitas isoladas foram identificadas como *Trypanosoma caninum*. A avaliação dos animais demonstrou que 90% deles estavam em bom estado geral e que 50% (10) apresentaram reatividade sorológica para Leishmaniose com títulos que variaram de 1:40 - 1:320. Todas as hemoculturas foram negativas, assim como o exame dos triatomíneos. A hipótese da circulação deste protozoário entre cães no município do Rio de Janeiro deve ser considerada. Discute-se a importância de se estabelecer um diagnóstico correto nesses animais e as possíveis consequências deste achado em áreas de ocorrência da Leishmaniose Visceral.

Palavras-chave: 1. *Trypanosoma caninum* 2. cão 3. Rio de Janeiro 4. Leishmaniose 5. diagnóstico

Pinto, A. G. S. **Characterization of flagellates of the genus *Trypanosoma*, Gruby 1843, in domestic dogs (*canis familiares*) in Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2009. f. Dissertation [Master in Clinical Research on Infectious Diseases] – Evandro Chagas Clinical Research Institute.

ABSTRACT

The involvement of the domestic dog with different members of the Trypanosomatidae family has been focused in several studies, due to the close relationship of this animal with man. Recently a new *Trypanosoma* species (*T. caninum*) infecting that animal was described in Rio de Janeiro and 19 similar isolates were later obtained. At first, it was suggested it was an occasional finding, however, other isolates, similar to the species initially described, were subsequently obtained from another 20 animals. This study aimed to identify 19 new isolates of the genus *Trypanosoma*, as well as the assessment of the animals and their environment. All samples were isolated from cultures of intact skin and analyzed morphologically, through biochemical assays by isoenzyme electrophoresis and molecular assays by PCR, using primers D75/76 (generic for trypanosomatids), D71/72 and 121/122 (*T. cruzi*-specific) and R1/R2 (*T. rangeli*-specific). The animals were evaluated for the presence of antibodies anti-*Leishmania* sp. by IFAT, and evaluated by blood cultures and xenodiagnosis. Through the tools applied in this study, all 19 samples of parasites isolated were identified as *Trypanosoma caninum*. The evaluation of the animals showed that 90% of them were in good condition and that 50% (10) showed serologic reactivity to Leishmaniasis with titles that ranged from 1:40 – 1:320. All blood cultures were negative, as well as the examination of triatomines. The hypothesis that this protozoan is disseminated among dogs in Rio de Janeiro must be considered. The importance of a correct diagnosis in those animals and the possible consequences in areas of occurrence of Visceral Leishmaniasis is discussed.

keywords: 1. *Trypanosoma caninum* 2. dog 3. Rio de Janeiro 4. Leishmaniasis 5. diagnosis

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Tabela 1** Sítio anatômico de isolamento das 20 amostras do gênero *Trypanosoma*, de cães domésticos no município do Rio de Janeiro, no ano de 2006. 16
- Tabela 2** Dados gerais de 20 cães avaliados neste estudo, apresentando resultados do diagnóstico parasitológico, hemocultura, xenodiagnóstico e sorologia pela IFI. 23
- Figura 1** Fotomicrografia dos estágios encontrados em cultura das amostras de *Trypanosoma* sp. estudadas. Observaram-se formas epimastigotas típicas (a, b, c), formas tripomastigotas (d) e formas esferomastigotas (e). Note a semelhança morfológica com *T. caninum* (f). (x 1000). 24
- Figura 2** Representação esquemática dos padrões eletroforéticos de 7 das 19 amostras estudadas. 6PG (6-phosphogluconate dehydrogenase, E.C.1.1.1.44); G6P (glucose-6-phosphate dehydrogenase, E.C.1.1.1.49); NH (nucleotidase, E.C. 3.2.2.1); PGM (phosphoglucomutase, E.C.2.7.5.1); IDH (isocitrate dehydrogenase E.C.1.1.1.42); MDH (malate dehydrogenase, E.C.1.1.1.37); MPI (mannose phosphate isomerase, E.C. 5.3.1.8); GPI (glucose phosphate isomerase, E.C. 5.3.1.9). 1: *T.cruzi* (Y); 2: *T.cruzi* (CL Brener); 3: *T.rangeli* (Choachi); 4 - 10: isolados 3, 19, 20, 42, 53, 59 e 60; 11: *T.caninum* (amostra A27). 26
- Figura 3** Perfil isoenzimático de 2 sistemas enzimáticos empregados nos 19 isolados obtidos de cães. A: PGM (phosphoglucomutase, E.C.2.7.5.1): 1: *T. cruzi* (Y); 2: *T. cruzi* (CL Brener); 3: *T. rangeli* (Choachi); 4 – 22: isolados de cães (3, 19, 20, 42, 53, 59, 60, 62, 118, 120, 176, 194, 201, 249, 259, 265, 271, 310 e 331); 23: *Trypanosoma caninum* (amostra A27). B: MDH (malate dehydrogenase, E.C.1.1.1.37): 1: *T. cruzi* (Y); 2: *T. cruzi* (CL Brener); 3: *T. rangeli* (Choachi); 4 – 22: isolados de cães (3, 19, 20, 42, 53, 59, 60, 62, 118, 120, 176, 194, 201, 249, 259, 265, 271, 310 e 331); 23: *Trypanosoma caninum* (amostra A27). 27
- Figura 4** Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers D75/76. 29
A: Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T.rangeli* (H14); 5 – 14 amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 15- *T.caninum* (amostra A27). B: Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T.rangeli* (H14); 5 – 13 amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 14- *T.caninum* (amostra A27); 15 – vazio.

- Figura 5** Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers D71/72. 30
A: Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T.rangeli* (H14); 5 – 14 amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 15- *T.caninum* (amostra A27). B: Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T.rangeli* (H14); 5 – 13 amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 14- *T.caninum* (amostra A27); 15- vazio.
- Figura 6** Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers R1/R2. 31
A: Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T.rangeli* (H14); 5 – 14 amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 15- *T.caninum* (amostra A27). B: Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T.rangeli* (H14); 5 – 13 amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 14- *T.caninum* (amostra A27); 15- vazio.
- Figura 7** Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers 121/122. 32
A: Slot 1- vazio; 2- marcador 100 bp; 3- 12: amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 13: *T. caninum* (amostra A27); 14: *T. cruzi* (Y); 15- *T.rangeli* (SC58). B: Slot 1- vazio; 2- marcador 100 bp; 3- 11: amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 12: *T. caninum* (amostra A27); 13: vazio; 14: *T. cruzi* (Y); 15- *T.rangeli* (SC58).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O gênero <i>Leishmania</i>	1
1.2. O gênero <i>Trypanosoma</i>	4
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Comitê de Ética e Biossegurança.....	13
3.2. Delineamento do estudo.....	13
3.3. Avaliação dos animais e do ambiente.....	13
3.3.1. Hemocultura.....	14
3.3.2. Realização de xenodiagnóstico e biópsia de pele.....	14
3.3.3. Testes sorológicos.....	15
3.4. Métodos laboratoriais utilizados na identificação das amostras de <i>Trypanosoma</i> sp. isoladas em cultura.....	16
3.4.1. Análise morfológica das amostras em cultura.....	17
3.4.2. Eletroforese de enzimas.....	17
3.4.3. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase.....	18
4. RESULTADOS	21
4.1. Avaliação dos animais e do ambiente.....	21
4.2. Hemocultura.....	21
4.3. Cultura de fragmentos de pele íntegra.....	22
4.4. Xenodiagnóstico.....	22
4.5. Testes sorológicos.....	22
4.6. Análise morfológica das amostras de <i>Trypanosoma</i> sp.	24
4.7. Eletroforese de enzimas.....	25
4.8. Reação em Cadeia da Polimerase.....	28
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8. ANEXOS	46
8.1. Ficha de avaliação dos animais e do ambiente.....	47
8.2. Termo de consentimento.....	51

1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias, desde os tempos mais remotos, acometem o homem e seus animais domésticos, com reflexo na qualidade de vida dos indivíduos afetados, cuja morbidade e mortalidade, ainda hoje, representam sérios problemas, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

As doenças de transmissão vetorial estão concentradas nas regiões tropicais e subtropicais, onde a condição climática é crucial para o desenvolvimento de inúmeras ordens e espécies de invertebrados que atuam como vetores. Nesse contexto, podemos destacar a Malária, as Leishmanioses e as Tripanossomíases, doenças de grande impacto na saúde humana, e que são atualmente consideradas como doenças negligenciadas (PEPIN; MEDA, 2001).

A ordem Kinetoplastida (Protozoa: Kinetoplastida) engloba um grupo de protozoários que possuem uma estrutura celular peculiar, o cinetoplasto, formado por uma complexa rede de DNA, contido numa mitocôndria única do protozoário. A família Trypanosomatidae destaca-se nesta ordem por conter agentes etiológicos responsáveis por importantes doenças nos seres humanos e animais (STUART et al., 2008). Esta família compreende gêneros que podem parasitar plantas (*Phytomonas*), insetos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*), répteis (*Sauroleishmania*) e mamíferos (*Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania*), cujos agentes possuem ciclo biológico monoxênico ou heteroxênico (VICKERMAN, 1976). As espécies monoxênicas, em condições naturais, não são patogênicas para o homem, ao contrário de algumas espécies heteroxênicas.

1.1. O gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania*, Ross 1903, envolve agentes que causam no homem e nos animais doenças com amplo espectro. As Leishmanioses apresentam duas formas clínicas básicas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) que ocorrem em diferentes ambientes, sendo endêmicas em cerca de 88 países dos continentes Americano, Africano, Asiático e Europeu. Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas (W.H.O., 2008) sendo apontadas como a segunda mais importante patologia causada por protozoários, do ponto de vista sócio-econômico e sanitário, depois da Malária. São

atualmente descritas cerca de 22 espécies associadas a ambas as formas da doença (ASHFORD, 2000; SILVEIRA et al., 2002).

Epidemiologicamente apresentam padrões distintos em variados aspectos, provocados principalmente pela multiplicidade de espécies do parasita, de insetos vetores, de diferentes reservatórios acometidos e dos diferentes fatores ambientais que afetam essa cadeia (MARZOCHI et al., 1994). A distribuição geográfica está associada às regiões tropicais e subtropicais, onde existe uma maior densidade de espécies vetores, dos gêneros *Phlebotomus*, responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo.

No Brasil, a prevalência da infecção humana varia de acordo com a região geográfica e a espécie de *Leishmania* envolvida (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). A LV foi descrita na Grécia em 1835, mas, foi na Índia que ficou popularmente conhecida como calazar (febre negra), pelos sintomas de febre e escurecimento da pele dos indivíduos acometidos. É causada por três espécies de parasitas do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* nas Américas. Dos milhares de casos de LV descritos anualmente em todo o mundo, 90% concentram-se em Bangladesh, nordeste da Índia, Nepal e Sudão (Velho Mundo) e nordeste do Brasil (Novo Mundo) (HERWALDT, 1999). No Brasil, a LV é descrita desde 1913, sendo atualmente registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com cerca de 1600 municípios das regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste, Sudeste e Sul, apresentando transmissão autóctone (M.S., 2006). A doença manifesta-se normalmente em caráter endêmico, sendo considerada crônica e de alta letalidade em indivíduos não tratados, cuja severidade depende normalmente do tempo de evolução da doença. O ciclo de transmissão envolve canídeos (silvestres e domésticos), *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Encontra-se urbanizada, ocorrendo em grandes cidades, mantidas principalmente pela presença de cães infectados e flebotomíneos adaptados a estes ambientes (SHERLOCK, 1996; EVANS et al., 1992). Nos cães a doença é de evolução lenta, sendo que na forma clássica o cão apresenta lesões cutâneas com descamação e eczema (normalmente em plano nasal e orelhas) e pequenas úlceras rasas (normalmente orelha, focinho, cauda e articulações). Nas fases mais avançadas da doença podem ser observados onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, hiperqueratose, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômitos. No final da doença

ocorre paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (DEANE; DEANE, 1955, MARZOCHI et al., 1985; ALMEIDA et al., 2005). Não existe tratamento para esses animais, que quando infectados, são encaminhados para eutanásia, devido à importância que possuem no ciclo de transmissão.

Pela gravidade da LV no homem, as ações sanitárias direcionadas para esta forma da doença são mais rigorosas que aquelas direcionadas à LT. Assim, programas de controle são implantados nas áreas endêmicas, objetivando interromper o ciclo de transmissão. Tais programas assumem três pontos principais: detecção e tratamento dos casos humanos; borrifação no domicílio e peridomicílio e monitoramento de cães domésticos, removendo e eliminando os sororeatores (M.S., 2006), uma vez que esse animal possui um papel já bem sedimentado, sendo considerado um importante reservatório doméstico (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

Com relação à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), aproximadamente 35 mil casos humanos são registrados por ano no Brasil (M.S., 2007), distribuídos por todo território e constituindo-se em sério problema de saúde pública. A LTA, em diversas regiões, apresenta caráter de transmissão peridomiciliar, principalmente pela adaptação de algumas espécies do inseto vetor aos ambientes naturais modificados, pelo aumento da população humana associado a uma ocupação desordenada, acarretando desequilíbrios ambientais. No ciclo epidemiológico da *L. (V.) braziliensis* o cão têm sido incriminado apenas como eventual hospedeiro, uma vez que seu papel como reservatório doméstico não pode ser, ainda, comprovado (REITHINGER; DAVIES, 1999).

O método parasitológico é considerado o método de escolha para o diagnóstico das Leishmanioses devido a sua especificidade de 100% embora com sensibilidade variáveis. Entretanto, às vezes é muito difícil a demonstração do parasita, sendo o método imunológico uma ferramenta alternativa, especialmente na LV (GONÇALVES et al., 2002). O diagnóstico, sempre que possível, deve ser realizado por testes laboratoriais associados aos dados clínicos e epidemiológicos. Na LV canina, os espécimes clínicos para o diagnóstico parasitológico podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado ou de linfonodos, biópsias de pele íntegra, de lesão cutânea ou de vísceras. Os exames podem ser feitos de forma direta ou indireta, este último através do isolamento parasitário em meio de cultura. Provas imunológicas, para pesquisa de anticorpos específicos, são

as mais empregadas nos inquéritos e em estudos epidemiológicos, devido à praticidade e facilidade da coleta de amostras (NUNES et al., 2001; ALMEIDA et al., 2005).

1.2. O gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma*, Gruby 1843, (Protozoa: Kinetoplastida) é composto por parasitas do sangue ou outros tecidos de vertebrados e do intestino de artrópodes. De acordo com o modo de transmissão, segundo Hoare (1972), os tripanossomas de mamíferos foram classificados nas seções Salivaria e Stercoraria.

Na seção salivaria estão alocados os seguintes subgêneros:

a) *Trypanozoon*: que engloba espécies com pequeno cinetoplasto sub-terminal, transmitidos ciclicamente como *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei*, causador da doença do sono na África e espécies como o *T. evansi* e *T. equiperdum* que parasitam principalmente equinos.

b) *Nannomonas*: pequenos tripanossomas com cinetoplasto de tamanho médio sempre marginal e que engloba espécies que parasitam o gado bovino, ovino e caprino como *T. (H) congolense* e *T. (H) simiae* que parasita porcos e macacos.

c) *Duttonella*: tripanossomas com cinetoplasto grande, sendo descrita apenas uma espécie (*T. (D) vivax*) que parasita gado bovino.

d) *Pycnomonas*: tripanossomas largos e monomórficos com cinetoplasto pequeno e sub-terminal como *T. (P) suis* que parasita porcos.

Nesta Seção foi alocado, inicialmente, também o sub-gênero *Tejeraia* proposto por Anez (1982) que englobava espécies como *T. (Tejeraia) rangeli*. Atualmente a posição taxonômica desta espécie é discutível, sendo classificada, por diversos autores na seção Stercoraria (GRIZARD, 2002).

A seção Stercoraria envolve três subgêneros:

a) *Megatrypanum*: tripanossomas grandes, com cinetoplasto próximo ao núcleo e afastado da extremidade posterior, cuja reprodução no mamífero é sob a forma epimastigota. *T. (M.) theileri* (gado bovino), *T. (M.) melophagium* (carneiro) e *T. (M) conorhini* (rato e macaco).

b) *Herpetosoma*: tripanossomas de tamanho médio, cinetoplasto em forma de bastão e núcleo discretamente posicionado na porção anterior, apresentando extremidade posterior do corpo pontuda. A reprodução no mamífero é feita sob a

forma amastigota ou epimastigota sendo a maioria parasita de roedores como *T. (H) lewisi*, de ratos e *T.(H) musculi*, de camundongos.

c) *Schizotrypanum*: são tripanossomas pequenos, com cinetoplasto grande e próximos da extremidade posterior, cuja multiplicação no mamífero é sempre intracelular, como forma amastigota. Neste subgênero está incluído *T. (S.) cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas e algumas espécies encontradas em morcego como *T. (S.) vespertilionis* e *T. (S.) dionisii*.

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma zoonose que afeta de 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina, onde mais de 100 milhões estão expostos ao risco da infecção sendo seu agente etiológico o *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (DIAS; MACEDO, 2005). Está distribuída em todo continente americano, ocorrendo com maior freqüência na Argentina, no Chile, na Venezuela e no Brasil (W.H.O, 2007).

O ciclo biológico do parasita alterna-se entre hospedeiro vertebrado, que apresentam formas amastigotas teciduais e tripomastigotas no sangue e formas tripomastigotas metacíclicas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, representado por diferentes gêneros e espécies de insetos triatomíneos da família Reduviidae. Sua transmissão pode ocorrer também por transfusão sanguínea, transplacentária, ingestão de alimentos contaminados e em indivíduos transplantados (REY, 2001a).

Trypanosoma cruzi possui uma diversidade morfológica e genética muito grande, que pode ser um reflexo da ampla diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados envolvidos no ciclo natural. Alguns autores classificaram esse agente em populações com perfis Z1, Z2 e Z3, de acordo com análises dos zimodemas (MILES et al., 1978) ou populações do tipo I e II, com base em análises moleculares (DEVERA et al., 2003).

No Brasil, a presença deste protozoário é relatada em praticamente todas as regiões (FERNANDES et al., 2001; RAMIREZ et al., 2002). No estado do Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil, a presença de *T. cruzi* já foi descrita em diferentes municípios: Miguel Pereira, associado ao *Triatoma vitticeps* (LOROSA et al., 2003); Teresópolis, associado ao *Rhodnius prolixus* (PINHO et al., 1998); e no município de Santa Maria Madalena, associado também a *T. vitticeps* (GONÇALVES et al., 2000).

Vários animais silvestres e domésticos são incriminados como reservatórios e importantes no ciclo de transmissão da doença (COHEN; GÜRTLER, 2001), sendo muitas dessas espécies reconhecidas como importantes reservatórios de *T. cruzi*, especialmente cães (CRISANTE et al., 2006). O cão além de ser um importante reservatório no ambiente peridomiciliar, principalmente em países da América Latina (MONTENEGRO, et al., 2002), também é vítima da doença desenvolvendo manifestações clínicas iguais as do homem, reproduzindo com fidelidade as fases aguda e crônica da doença (ANDRADE et al., 1997), sendo considerado um bom modelo experimental desta Tripanossomíase. Alguns autores consideram esse animal como uma importante sentinela natural da doença, constituindo também um foco nas campanhas de controle (CASTANERA, et al., 1998). Segundo Montenegro et al. (2002), áreas onde o *Triatoma infestans* é o principal vetor domiciliar, a taxa de infecção por *T. cruzi* nos cães excedeu os valores em humanos.

A doença nos caninos é primariamente uma cardiomiopatia que se desenvolve em conseqüência do dano causado pelo parasito às células do miocárdio ou reações imunomediadas. Os sinais clínicos apresentam duas fases, a fase aguda, caracterizada por miocardite ou encefalite em cães jovens e a fase crônica, caracterizada pela cardiomiopatia dilatada em cães idosos (TILLEY; SMITH JR, 2003).

Embora o Brasil seja uma área endêmica para doença de Chagas e o cão reconhecido como um reservatório do *T. cruzi*, a maioria dos trabalhos com esse animal foram realizados após inoculações experimentais ou baseados na identificação de alterações *post-mortem* (SOUZA et al., 2008).

Nas Américas outra espécie de tripanossoma freqüentemente encontrado infectando homens, animais domésticos e silvestres é *T. (H.) rangeli*. Sua transmissão ocorre por triatomíneos principalmente do gênero *Rhodnius*. Embora esse agente não cause doença para o hospedeiro vertebrado, sua importância se deve ao compartilhamento de reservatórios e vetores comuns com *T. cruzi* (RAMIREZ et al., 2002;) dificultando o diagnóstico diferencial na infecção, uma vez que as áreas de ocorrência de ambos agentes estão na maioria das vezes em sobreposição (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004). A infecção em cães já foi descrita por Pifano et al. (1948) e D`Alessandro (1976).

A presença simultânea de *T. cruzi* e *T. rangeli* na mesma região geográfica permite a ocorrência de infecções mistas nos hospedeiros vertebrados e nos

invertebrados. Embora *T. rangeli* não seja patogênico para hospedeiros vertebrados, induz resposta imune com reação cruzada com *T. cruzi*, representando uma barreira para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas onde esses parasitas coexistem (RAMIREZ et al., 2002).

Várias espécies do gênero *Trypanosoma* causam doença de considerável importância médica e veterinária conhecidas de acordo com o agente etiológico como Surra ou Mal de Cadeiras (*T. evansi*); Nagana (*T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*); Doença do Sono (*T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*) e Durina (*T. equiperdum*). A Tripanossomíase animal constitui um sério problema sanitário na maioria dos países onde ela ocorre sendo muitas vezes necessário à utilização de drogas para o seu controle.

Dentre o grupo de tripanossomas de importância veterinária, *Trypanosoma evansi* é o agente causal de uma importante doença conhecida popularmente como “Surra” que afeta uma grande variedade de mamíferos domésticos e silvestres. No Brasil a doença em eqüinos é conhecida como “Mal de Cadeiras” e é endêmica no Pantanal sul-mato-grossense onde, além de eqüinos, acomete capivaras, quatis e cães (NUNES; OSHIRO, 1990, FRANKE et al., 1994). É a única espécie do subgênero *Trypanozoon* da seção Salivaria que ocorre na América Latina. Este protozoário teve sua origem no continente africano e foi introduzida nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus. Desde então tem causado inúmeros surtos com muitas mortes de eqüinos, resultando em elevados prejuízos aos sistemas pecuários extensivos que dependem do cavalo para o seu manejo. Foi o primeiro tripanossoma patogênico para mamíferos a ser descoberto, tendo sido descrito pela primeira vez na Índia em 1880 (HOARE, 1972). É uma espécie de grande distribuição mundial, sendo encontrado no norte e centro do continente africano, sudoeste da Ásia, partes da Europa, América Central e do Sul. Estima-se que 6.462 eqüinos sejam afetados anualmente, gerando prejuízos da ordem de 2,4 milhões de dólares (SEIDL et al., 1998).

Em cães, a doença é caracterizada por altas taxas de morbidade e mortalidade e os principais sinais clínicos incluem febre de caráter intermitente, anemia progressiva, caquexia, edema de cabeça, região faríngea e de membros, linfadenopatia, paralisia de membros posteriores ataxia, incoordenação, contrações tônico-clônicas e opistótomo e opacidade de córnea. Infecções naturais em cães com manifestação de sinais clínicos severos têm sido relatadas em diferentes

estados do Brasil (AQUINO, 2007). Um levantamento realizado na região do pantanal mato-grossense por Franke et al. (1994) revelou a prevalência da infecção por *T. evansi* em 30% dos cães examinados. A presença de animais infectados, como os cães, é tida em algumas situações, como uma fonte de propagação deste protozoário (FRANKE, et al., 1994). No Brasil, foram descritas duas formas da doença causada por *T. evansi* a síndrome aguda, que causa morte rápida em eqüinos e cães não-tratados, e a crônica, que afeta diversos animais silvestres, principalmente capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e quatis (*Nasua nasua*) (HERRERA et al., 2005). A transmissão deste agente é feito de modo mecânico por intermédio de dípteros hematófagos dos gêneros *Stomoxys* e *Tabanus* com cerca de 50 espécies incriminadas no ciclo de transmissão. Outras formas de transmissão podem ocorrer como através do morcego hematófago *Desmodus rotundus*, uma vez que os tripomastigotas multiplicam-se na corrente circulatória desses animais, os quais podem permanecer infectados por até um mês, atuando, dessa maneira, como vetor e também hospedeiro do parasita; através da transmissão oral em carnívoros que se alimentam da carcaça de animais infectados, experimentalmente em cães pela ingestão de sangue e de tecidos infectados e transmissão transplacentária em camundongos experimentalmente infectados (AQUINO, 2007).

Outro tripanossomatídeo de importância veterinária é o *Trypanosoma vivax* que infecta um grande número de espécies de ungulados selvagens e domésticos, sua origem é Africana, foi introduzida nas Américas no século 19 por colonizadores europeus, sendo a primeira ocorrência do *T. vivax* nas Américas observada na Guiana Francesa em 1919. Sua introdução gerou muita preocupação dos produtores e defesa sanitária animal em diversos países do continente Sul Americano e ilhas do Caribe. Este parasita, contudo, tem se expandido para outras áreas da África e América Central, América do Sul e Caribe. Na África é o responsável pela Tripanossomíase em eqüinos, bovinos e outros ruminantes, sendo no Oeste da África considerado o mais patogênico e importante tripanossoma que afeta os bovinos. Cães e suínos são refratários ao mesmo. Esta espécie é encontrada em áreas ocupadas pela mosca tsé-tsé na África (SILVA et al., 2002). No Brasil, a ocorrência do *T. vivax* foi mencionada pela primeira vez por Boulhosa (1946) em bovinos da zona bragantina no Estado do Pará, posteriormente Shaw e Lainson (1972) descreveram o parasita em um búfalo (*Bubalis bubalis*) nas proximidades da

cidade de Belém, Pará. Outros relatos sobre *T. vivax* foram também feitos no Amapá, região Amazônica e Pantanal (SILVA et al., 2002).

Esse tripanossoma é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé e mecanicamente por outras moscas hematófagas. Esta espécie pode provocar doença fatal associada a uma parasitemia alta e de forma persistente. Resposta imune reduzida, hemorragias e anemias têm sido verificado em bovinos infectados com *T. vivax*. Na forma aguda os animais morrem dentro de cinco semanas e apresentam alta temperatura, letargia, fraqueza, anemia, leve perda na condição física, lacrimejamento, diarreia, perda de peso (SILVA et al., 2002).

Um importante tripanossoma causador da doença no gado na África é *Trypanosoma congolense* resultando em significativas perdas econômicas. Através de estudos experimentais nesses animais, observou-se que a patogenicidade do parasita talvez pudesse estar relacionada à cepa utilizada (BENGALY et al., 2002). Existem poucas publicações de *T. congolense* relatando a infecção em cães (GOW et al., 2007). Horchner et al. (1985) demonstrou que cães do leste da África desenvolveram menores parasitemias e nenhum sinal clínico quando comparados com cães da raça Beagle da Europa, sugerindo tolerância de cães nativos de áreas endêmicas. Harrus et al. (1995) relatam infecção de 2 cães importados do Kenia para Israel, ambos os animais desenvolveram sinais agudos e evoluíram para morte. Gow et al. (2007) e Hooft (2008) relatam a infecção crônica de 1 cão por *T. congolense* no Reino Unido, em ambos os relatos os animais tiveram histórico de passagem por áreas endêmicas e no primeiro caso houve morte do animal e no segundo o animal respondeu bem ao tratamento.

A Doença do Sono ou Tripanosomíase Africana Humana é causada por *Trypanosoma b. gambiense* e *Trypanosoma b. rhodesiense*, sendo frequentemente fatal no homem se não tratada. Na África oriental é causada por *T. b. rhodesiense* e na África ocidental por *T. b. gambiense*. Sua distribuição é exclusivamente Africana, devido ao fato de a transmissão depender de insetos do gênero *Glossina* (mosca t-sé-tsé) (REY, 2001b). Animais domésticos e silvestres são encontrados infectados por ambas as espécies.

Uma terceira subespécie do grupo brucei (*T. brucei brucei*) é distinguida das outras subespécies deste grupo pela inability de infectar humanos (NJIRU et al., 2004). Cães são susceptíveis a infecção por esta espécie, sendo considerado altamente patogênico ocasionando sinais de depressão, anorexia, descarga ocular,

pirexia e edema de face, sendo que estes animais respondem pouco ao tratamento (NJIRU et al., 2004). *T. b. brucei* também causa grandes prejuízos em animais de produção (AKPA et al., 2008).

A Durina é causada por *Trypanosoma equiperdum*, acometendo eqüinos e asininos, sendo encontrado na África, Ásia, Europa, Rússia e México. Sua transmissão ocorre de forma venérea. Alguns sinais e sintomas que os animais costumam apresentar são edema abdominal ventral e genital, placas urticariformes e emagrecimento progressivo, sendo uma doença fatal se não tratada (GILLINGWATER et al., 2007).

Como pode ser apreendido pela diversidade de agentes etiológicos e morbidade potencial, a morbidade e a mortalidade resultante das doenças causadas por protozoários representam ainda hoje um desafio à pesquisa científica e aos programas de saúde pública e animal. O cão doméstico pela grande proximidade com o homem não só está exposto aos agentes causadores da doença humana, como também expõem o homem aos seus parasitas, sendo considerado um importante elo de certas zoonoses.

Os movimentos migratórios do homem com seus animais, associado às alterações ambientais favorecem a propagação e instalação de certos parasitas em áreas propícias. Esse processo auxilia, também, a sobreposição de áreas endêmicas, contribuindo para o surgimento de infecções mistas humanas e animais.

O aparecimento de infecções mistas muitas vezes confunde o diagnóstico, uma vez que nem sempre a demonstração direta do parasita é possível e, por outro lado, a correta descrição dos agentes envolvidos é fundamental para ações de vigilância.

A co-infecção natural de cães domésticos com diferentes tripanossomatídeos têm sido descritas em diferentes partes do Brasil. Savani et al. (2005) relatam a co-infecção de *Leishmania (L) chagasi* e *Trypanosoma evansi* em cão no estado de Mato Grosso do Sul. No município do Rio de Janeiro, Madeira et al. (2006a) descreveram um caso de co-infecção por *L (V) braziliensis* e *L (V) chagasi*. Este caso, só foi possível após isolamento e caracterização das amostras isoladas, uma vez que o diagnóstico da LV canina é dado por ferramentas sorológicas, que não possui poder discriminatório para ambas formas da doença. Neste mesmo município Madeira et al. (2004) também descreveram um caso de co-infecção canina, desta vez por *L (V) braziliensis* e um protozoário do gênero *Trypanosoma*, posteriormente

identificado como uma nova espécie, sendo nomeado *Trypanosoma caninum* (MADEIRA et al., 2009), chamando atenção para a possível ocorrência de outros tripanossomatídeos nessa região em cães domésticos.

Estes relatos demonstram que os cães domésticos são susceptíveis à diferentes membros da família Trypanosomatidae inclusive em co-infecções em áreas endêmicas sobrepostas. Tais relatos chamam atenção para a aplicação de ferramentas que possam discriminar tais agentes uma vez que ferramentas sorológicas, muito empregada no diagnóstico desses animais não possuem poder discriminatório entre os diferentes membros da família Trypanosomatidae.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar por métodos biológicos, bioquímicos e moleculares isolados de *Trypanosoma* sp. obtidos de 20 cães domésticos do município do Rio de Janeiro.

2.2. Objetivos Específicos

- i. Descrever morfológicamente as formas de cultivo axênico das amostras de *Trypanosoma* sp. isoladas;
- ii. Caracterizar bioquimicamente as amostras isoladas através da eletroforese de enzimas;
- iii. Caracterizar pela técnica de PCR (Reação em cadeia de polimerase) as formas de cultivo axênico e fragmentos de pele íntegra obtidas dos animais onde houve isolamento parasitário;
- iv. Avaliar pela técnica de IFI (Imunofluorescência Indireta) a presença de anticorpos (IgG) específicos para *Leishmania*, em amostras de soro dos cães nos quais isolou-se as amostras de *Trypanosoma* sp.;
- v. Realizar hemocultura nos animais onde houve isolamento parasitário;
- vi. Descrever detalhes de procedência e hábitos dos cães.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética e biossegurança

Este trabalho originou-se a partir de um projeto inicial ¹ já aprovado pelo Comitê de Ética de Usuários de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob o número P.0298-06.

3.2. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo cujo objetivo maior é a identificação de amostras do gênero *Trypanosoma* isoladas de cães domésticos, durante estudo das Leishmanioses caninas realizado em 2006, no município do Rio de Janeiro. A partir desse achado, este trabalho objetivou, também, a avaliação clínica dos animais, dos quais se obteve o isolamento parasitário e do ambiente de moradia dos mesmos.

3.3. Avaliação dos animais e do ambiente

Os animais, dos quais isolou-se amostras de *Trypanosoma* sp., foram avaliados clinicamente no momento do inquérito epidemiológico, no estudo de 2006 (1º visita) relacionado ao projeto inicial¹. Os dados foram coletados de acordo com informações contidas nas fichas dos animais, preenchidas na ocasião do inquérito.

A residência dos animais foi visitada 6 meses após o inquérito epidemiológico (2º visita), para uma reavaliação clínica dos cães, coleta de amostras biológicas. Coletou-se uma nova amostra de pele íntegra (cultura), sangue (hemocultura) e confeccionaram-se esfregaços em lâmina para exame direto. Nesse momento, o ambiente e o hábito dos animais foram avaliados a partir da aplicação de um questionário. A presença de insetos (triatomíneos, flebotomíneos, mosquitos, e etc), foi também investigada. Este questionário encontra-se no Anexo 1.

¹(*Leishmania (Leishmania) chagasi* em cães domésticos (*Canis familiaris*) soronegativos em área endêmica na cidade do Rio de Janeiro). Tese de Doutorado de Fabiano B. Figueiredo pelo Curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do IPEC.

Foi realizada uma terceira visita, 6 meses após, na qual foi realizada o xenodiagnóstico, além de coleta de sangue (hemocultura) e coleta de nova amostra de pele íntegra (cultura).

3.3.1. Hemocultura

De cada animal foi retirado cerca de 5 ml de sangue periférico colhido com anticoagulante de forma asséptica e transportado sob refrigeração. No laboratório, o sangue foi centrifugado a 5000 rpm durante vinte minutos em rotor móvel (Centrifuge 5810 R, Alemanha) e o plasma desprezado. Ao sedimento de hemáceas adicionou-se cerca de 6 mL de meio Schneider (Sigma, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino - SFB (Cultilab, Brasil) que após suave homogeneização foi distribuído para três tubos contendo uma base de Agar (meio NNN - Novy, Nicolle e McNeal). Os tubos foram submetidos à temperatura de 26-28°C em estufa biológica (Novatécnica, Brasil) e exames a fresco foram realizados a cada 15 dias durante dois meses para pesquisa de formas flageladas. Com 30 dias, os tubos foram suplementados com 1mL de meio Schneider com 10% de SFB.

As lâminas com esfregaços sanguíneos foram coradas pelo Giemsa (DE CARLI, 2001) e examinadas por microscopia ótica. O exame foi feito fazendo uma varredura percorrendo cerca de 300 campos em cada lâmina (X1000).

3.3.2. Realização de xenodiagnóstico e biópsia de pele

Dos 20 animais estudados, avaliou-se em dois momentos distintos a possibilidade de re-isolamento parasitário, a partir da coleta e cultivo de fragmentos de pele do mesmo local onde inicialmente isolou-se as amostras de *Trypanosoma* sp.

O xenodiagnóstico foi realizado utilizando ninfas de *Rhodinus neglectus* obtidas junto ao Laboratório de Referência em Triatomíneos - IOC /Fiocruz. Os animais foram sedados e cerca de 50 ninfas, em jejum, foram colocadas em contato com o animal, no mesmo local onde os parasitas foram inicialmente isolados (pele da orelha ou pele da escápula). Os insetos foram colocados em um recipiente plástico coberto por uma tela de filó presa à abertura superior do frasco por fita

elástica. Os triatomíneos ficaram em contato com o animal até se alimentarem, aproximadamente por 30 minutos. Após o xenodiagnóstico, foi realizada nova biópsia de pele, nesse mesmo local, para isolamento em cultura. Após anestesia local, tricotomia e anti-sepsia, coletaram-se três fragmentos de cerca de 3mm que foi imediatamente colocado em solução fisiológica e posteriormente semeados, separadamente, em tubos contendo meio bifásico (NNN + Schneider + 10% de SFB). As culturas foram examinadas a fresco em intervalos semanais durante 30 dias.

Os insetos que não se alimentaram foram desprezados e os alimentados foram mantidos a temperatura ambiente e avaliados após 15, 30, 45 e 50 dias da alimentação. Nesses intervalos, o triatomíneo foi sacrificado em câmara anestésica com éter etílico (Isofar, Brasil) em capela de exaustão de gases (Permuton, Brasil) e com auxílio de uma pinça retirou-se todo o tubo digestivo, que foi depositado em lâmina, homogeneizado com uma gota de salina e examinado ao microscópio ótico (Nikon, China) para a presença de flagelados. Examinou-se, também a hemolinfa e as glândulas salivares de todos os insetos.

3.3.3. Testes sorológicos

Os soros de todos os animais foram colhidos no momento do inquérito epidemiológico (1ª visita) e estocados a - 20°C. Para a pesquisa de anticorpos específicos anti - *Leishmania* sp. foi empregada a técnica de IFI (Imunofluorescência indireta) utilizando Kit produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as lâminas foram cobertas com 10 µL da suspensão antigênica e incubadas a 37°C por 2 horas. Os soros foram diluídos a partir de 1:40 até a diluição de 1:640 em salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2. Após incubação a 37°C em câmara úmida por 30 minutos, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS e 1 vez por 1 minuto em água destilada. Após secarem por 10 minutos a 37°C foi adicionado o conjugado anti-imunoglobulina G canina marcada com isotiocianato de fluoresceína previamente titulado e diluído em Azul de Evans a 1:25 no tampão PBS. Uma nova incubação foi feita em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. A lavagem desta etapa foi realizada como descrito acima. E após, foram montadas com glicerina tamponada e fechadas com lamínula

para a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus BX, Japão). Títulos iguais ou superiores à 1:40 foram considerados positivos.

3.4. Métodos laboratoriais utilizados na identificação das amostras de *Trypanosoma* sp. isoladas em cultura

Todos os isolados avaliados neste estudo foram obtidos a partir do cultivo de fragmentos de pele íntegra da região escapular ou da orelha de cães residentes em diferentes áreas endêmicas de LV canina. Todas as amostras foram criopreservadas e depositadas no Banco de amostras do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish/IPEC) e mantidas em meio de cultura por repiques semanais. A relação dessas amostras está apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Sítio anatômico de isolamento das 20 amostras do gênero *Trypanosoma* de cães domésticos no município do Rio de Janeiro, no ano de 2006.

Nº do cão/amostra	Sítio anatômico do isolamento no cão
3	Pele da orelha
19	Pele da escápula
20	Pele da escápula
42	Pele da escápula
53	Pele da orelha
59	Pele da escápula
60	Pele da orelha
62	Pele da escápula
66	Pela da orelha*
118	Pele da orelha
120	Pele da orelha
176	Pele da orelha
194 O; 194 E	Pele da orelha e escápula**
201	Pele da orelha
249	Pele da escápula
259	Pele da escápula
265	Pele da orelha
271	Pele da orelha
310	Pele da escápula
331	Pele da escápula

* amostra perdida

** isolamento de dois sítios do mesmo animal. Para o estudo, considerou-se apenas a amostra isolada da região da orelha.

3.4.1. Análise morfológica das amostras em cultura

Para as análises morfológicas foram confeccionados esfregaços em lâmina de vidro com formas de cultura, em fase exponencial, de cada isolado. As lâminas, quando completamente secas, foram fixadas em álcool metílico (Isofar, Brasil) e secas a temperatura ambiente. Após, as lâminas foram tratadas com ácido clorídrico (HCL- Isofar, Brasil) 1N durante 10 minutos e lavadas em água corrente. A coloração foi feita com Giemsa, diluído em tampão fosfato (pH 7.2). Quando completamente secos as lâminas foram montadas utilizando-se uma resina Permount (Fisher Chemical, USA). A análise microscópica foi feita em objetiva de imersão (x 1000), selecionando-se as diferentes formas encontradas para posterior fotografia (Zeiss; Axiophot 2, Alemanha) e confecção de uma prancha.

3.4.2. Eletroforese de enzimas

Cada amostra isolada, cultivada em NNN / Schneider foi transferida, separadamente, para garrafa de cultura de células para ampliação do crescimento parasitário. Empregou-se inicialmente cerca de 10 ml de Schneider suplementado com 10% de SFB com inóculo aproximado de 10%. O crescimento parasitário foi acompanhado diariamente por microscopia em microscópio invertido (Nikon, China) e, por volta do 3º dia do inóculo foi acrescentado cerca de 20 ml de meio Schneider suplementado com SFB de acordo com o crescimento parasitário. Ao final de aproximadamente 7 dias, o conteúdo das garrafas foi transferido para tubos do tipo Falcon (TPP, Suíça) de 50 mL e submetidos a centrifugação durante 10 minutos a 7000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 10 ml de tampão de lavagem pH 8,0 (NaCl 0,85%; Vetec, Brasil, adicionado de 0,01M de EDTA; Sigma, EUA) e lavado por duas vezes nas mesmas condições anteriores. Na última lavagem o sedimento foi ressuspense em 1,5 ml de tampão, transferido para criotubos (TPP, Suíça) capacidade de 2,0 ml e centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, ficando no tubo uma quantidade de tampão suficiente para cobrir o sedimento. Os tubos foram estocados em botijões contendo nitrogênio líquido até a realização das corridas eletroforéticas.

Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose 1% (Tipo V; Sigma, EUA) acrescida de tampão fosfato ou maleico, que depois de dissolvida e fundida foi colocada sobre um filme de poliestireno onde a amostra teste foi aplicada. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese horizontal (Amersham Biosciences, Suécia) devidamente acoplada a um banho circulador para manter a refrigeração em torno de 4°C. A corrente aplicada dependeu do tampão empregado na corrida.

A revelação da atividade enzimática foi feita, colocando-se diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima já descritos na literatura (CUPOLILLO et al., 1994). A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético (Merck, Alemanha) a 5% até que o excesso de corante fosse totalmente eliminado.

Todas as amostras foram analisadas por 8 sistemas enzimáticos: glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PPDH; E.C.1.1.1.49; Sigma, EUA), isocitrato desidrogenase (IDHNADP; E.C.1.1.1.42; Sigma, EUA), malato desidrogenase (MDH; E.C.1.1.1.37; Sigma, EUA), fosfo-glico desidrogenase (6PGDH; E.C.1.1.1.43; Sigma, EUA), nucleotidase (NH; E.C.3.2.2.1; Sigma, EUA), glicose fosfo-isomerase (GPI; E.C.5.3.1.9; Sigma, EUA), fosfo-gluco-mutase (PGM; E.C.1.4.1.9; Sigma, EUA) e manose fosfato desidrogenase (MPI; E.C.5.3.1.8; Sigma, EUA). Os perfis eletroforéticos, das 19 amostras do estudo, foram comparados com amostras de referência: *Trypanosoma caninum* (amostra A27), *Trypanosoma cruzi* (Y e CL Brener), *Trypanosoma rangeli* (Choachi). As amostras de referência foram obtidas junto à Coleção de Tripanossomatídeos (IOC).

3.4.3. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para esta metodologia foram processadas formas isoladas em cultura e fragmentos de pele íntegra de todos os animais. Os fragmentos de pele foram colhidos na época do inquérito do projeto inicial¹, e armazenados à -20°C.

Para o isolamento do DNA das formas de cultura utilizamos 1 mL de DNAzol (Invitrogen, EUA) para a cada 100µl da alíquota da cultura centrifugada (MSE,

Microcentaur, Reino Unido) e lavada. Neste caso, submeteu-se amostra a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo contendo 500 µl de etanol 100% e o sedimento desprezado. Os tubos foram homogeneizados lentamente por inversão (50 vezes) e centrifugado por 5 minutos a 6000 rpm, sendo o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado com 700 µl de etanol (75%) invertendo os tubos de 3 a 6 vezes. Em cada lavagem os tubos foram centrifugados durante 1 minuto a 13.000 rpm. Os tubos foram posicionados verticalmente para secarem durante 20 minutos e após, foi adicionado 25 µl de hidróxido de sódio (Merck, Alemanha) e estocados a -20°C para posterior análise molecular.

Para extração do DNA das amostras de tecido, foi utilizado o Kit "Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin (GE, Reino Unido). Resumidamente, cerca de 10-25 µg de pele foram macerados com o auxílio de pistilo e colocados em tubo contendo solução de lise celular e proteinase K (20 mg/ml) e submetidos à temperatura de 65°C durante 3h. Após a incubação, acrescentou-se RNase A (2 mg/ml) invertendo o tubo diversas vezes e incubando-o à 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionada solução de precipitação de proteínas, homogeneizando vigorosamente, e após centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo isopropanol (100%), invertendo o tubo até a formação de um precipitado branco. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e adicionado etanol 70%, centrifugando e desprezado novamente o sobrenadante. Ao final do processo foi adicionada solução de hidratação do DNA. Os tubos foram estocados a -20°C para posterior análise molecular.

A detecção de DNA do parasita, em amostras de cultura, foi realizada através da amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando diferentes alvos moleculares. Utilizou-se seqüências que amplificam regiões conservadas de todos os tripanosomatídeos com primers D75 (5' GCAGATCTTGGTTGGCGTAG 3') e D76 (5' GGTTCTCTGTTGCCCTTTT 3') (SOUTO et al., 1999); seqüências específicas para *T. cruzi* com primers D71(5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG 3') e D72 (5' TTTTCAGAATGGCCGAACAGT 3') (SOUTO; ZINGALES, 1993) e 121 (5' AAATAATGAACGGG(T/G)GAGATGCATGA 3') e 122 (5' CGCGGCTCGCACTGCACCTC 3') (WINKER et al., 1994). Utilizou-se, também seqüências específicas de *T. rangeli* com primers R1 (5'

CGCGGCTCGCACTGCACCTC 3') e R2 (5' GGCGCATCCACCGAGCACTG 3') (VARGAS et al., 2000).

Para as amostras de tecido (pele) empregaram-se os primers 121/122 e R1/R2 conforme descrito acima. O protocolo das reações assim como os ciclos de amplificação foram baseados na literatura apresentada no parágrafo acima.

Amostras de *Trypanosoma caninum* (amostra A27), *T. rangeli* (H14, SC58) e *T. cruzi* (Y e DM28C) foram utilizadas como controles positivos das reações.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 2% (Invitrogen, Espanha). Foram adicionados ao gel, 10,0 µl do produto amplificado com 5,0 µl de corante e submetido a uma corrida de 80 V por aproximadamente 2h. Foi utilizado como marcador de tamanho de DNA - 100 Base-Pair DNA Ladder (Amersham Pharmacia). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (Invitrogen, EUA) 0,5 µg/ml, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho LPIX (Loccus biotecnologia, Brasil).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos animais e do ambiente

Na primeira visita, realizada durante o inquérito epidemiológico, dos 20 animais estudados 18 demonstraram bom estado geral, tendo dois animais demonstrado emagrecimento. Constatou-se que 18 moradias localizavam-se em área rural e 2 em área urbana. Dos 20 animais, 17 eram domiciliados no bairro de Guaratiba e 3 no bairro de Campo Grande. Todos eram nascidos no próprio bairro de residência ou em bairros próximos.

Na segunda visita, 9 cães puderam ser reavaliados, todos demonstrando bom estado geral e presença de ectoparasitos. Os demais animais morreram, nesse período, por causas desconhecidas ou devido eutanásia para controle da LV ou mudaram-se para local não informado. Dos 9 animais avaliados, observou-se que 4 tinham acesso livre à rua e todos dormiam no quintal das residências. A presença de morcegos, moscas e mosquitos foi relatado por proprietários em 8 das nove residências visitadas. Com relação à presença de flebotomos e triatomíneos, todos os proprietários visitados não demonstraram segurança nas afirmações, pelo desconhecimento de tais vetores.

Na terceira visita, 5 dos 9 animais avaliados na segunda visita puderam ser reavaliados, todos apresentando bom estado geral. Os demais animais não puderam ser avaliados devido a disponibilidade dos proprietários e a disponibilidade de triatomíneos necessário para realização do xenodiagnóstico.

Os dados gerais dos 20 animais avaliados neste estudo estão apresentados na Tabela 2.

4.2. Hemocultura

A hemocultura foi realizada em 9 animais na segunda visita e repetida em cinco cães na terceira visita, todas apresentando resultados negativos para a presença de flagelados. Da mesma forma, a análise direta, em esfregaços sanguíneos, não demonstrou a presença de flagelados ou qualquer outro parasita.

4.3. Cultura de fragmentos de pele íntegra

Dos 9 animais examinados na 2º visita, o isolamento pôde ser obtido em apenas um deles (11,1%). Na 3º visita nenhum dos animais apresentou isolamento positivo.

4.4. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico foi realizado em 5 cães, durante a 3ª visita. Cerca de 40 triatomíneos alimentaram-se em cada um dos animais. Em cada um dos intervalos propostos (15, 30, 45 e 50 dias), 10 insetos foram examinados, apresentando resultado negativo para a presença de flagelados no tubo digestivo, hemolinfa e glândulas salivares em todos os casos.

4.5. Testes sorológicos

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., pela técnica de Imunofluorescência Indireta, foi realizada nos 20 animais. Destes, 10 (50%) apresentaram reatividade sorológica com os seguintes títulos sorológicos: 1:40 (1 animal); 1:80 (7 animais); 1:160 (1 animal); 1:320 (1 animal). Dez animais (50%) apresentaram resultados negativos.

Tabela 2: Dados gerais de 20 cães avaliados neste estudo, apresentando resultados do diagnóstico parasitológico, hemocultura, xenodiagnóstico e sorologia pela IFI.

Cão Nº	Procedência do animal	Sítio anatómico da Biópsia (1ª visita)	1ª visita: 2006 Biópsia	2ª visita: 01/2007 HMC/Biópsia	3ª visita: 07/2007 Xeno/HMC/Biópsia	IFI (<i>Leishmania</i> sp.)
3	C. Grande	Orelha /Lesão	Orelha: pos Lesão: cont	Eutanásia: não realizada visita	-	NR
19	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	HMC: neg Biópsia escápula: neg	Xeno: neg HMC: neg Biópsia escápula: neg	NR
20	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	HMC: neg Biópsia escápula: neg	Xeno: neg HMC: neg Biópsia escápula: neg	NR
42	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	HMC: neg Biópsia escápula: neg	Não realizada	NR
53	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	HMC: neg Biópsia orelha: neg	Não realizada	1:160
59	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	Mudou-se: não realizada visita	-	1:80
60	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: cont	HMC: neg Biópsia orelha: neg	Não realizada	1:80
62	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	Morreu: não realizada visita	-	1:80
66*	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	HMC: neg Biópsia orelha: neg	Xeno: neg HMC: neg Biópsia orelha: neg	NR
118	C. Grande	Orelha / Escáp	Orelha: Pos Escáp: neg	Eutanásia: não realizada visita	-	1:80
120	C. Grande	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	Eutanásia: não realizada visita	-	1:320
176	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	HMC: neg Biópsia orelha: neg	Xeno: neg HMC: neg Biópsia orelha: neg	1:80
194**	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: pos	Eutanásia: não realizada visita	-	NR
201	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	Morreu: não realizada visita	-	NR
249	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	Eutanásia: não realizada visita	-	NR
259	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	Morreu: não realizada visita	-	1:80
265	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	HMC: neg Biópsia orelha: neg	Não realizada	NR
271	Guaratiba	Orelha / Escáp	Orelha: pos Escáp: neg	HMC: neg Biópsia orelha: pos	Xeno: neg HMC: neg Biópsia orelha: neg	1:40
310	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: pos	Eutanásia: não realizada visita	-	NR
331	Guaratiba	Orelha / Escáp	Escáp: pos Orelha: neg	Morreu: não realizada visita	-	1:80
20 cães			21 isolados	9 visitas	5 visitas	10 cães IFI ≥1:40

HMC= hemocultura; Xeno – xenodiagnóstico; Cont= contaminado; Pos= positivo; Neg=negativo*amostra perdida; ** dois sítios de isolamento

4.6. Análise morfológica das amostras de *Trypanosoma* sp.

Todas as 19 amostras isoladas em cultura estudadas demonstraram bom crescimento em meio NNN / Schneider suplementado com 10% de SFB à 28°C. A avaliação morfológica demonstrou formas epimastigotas típicas similares em todos os isolados e na amostra de *T. caninum* (amostra A27), utilizada como padrão. Formas tripomastigotas e esferomastigotas também foram observadas (Figura 1).

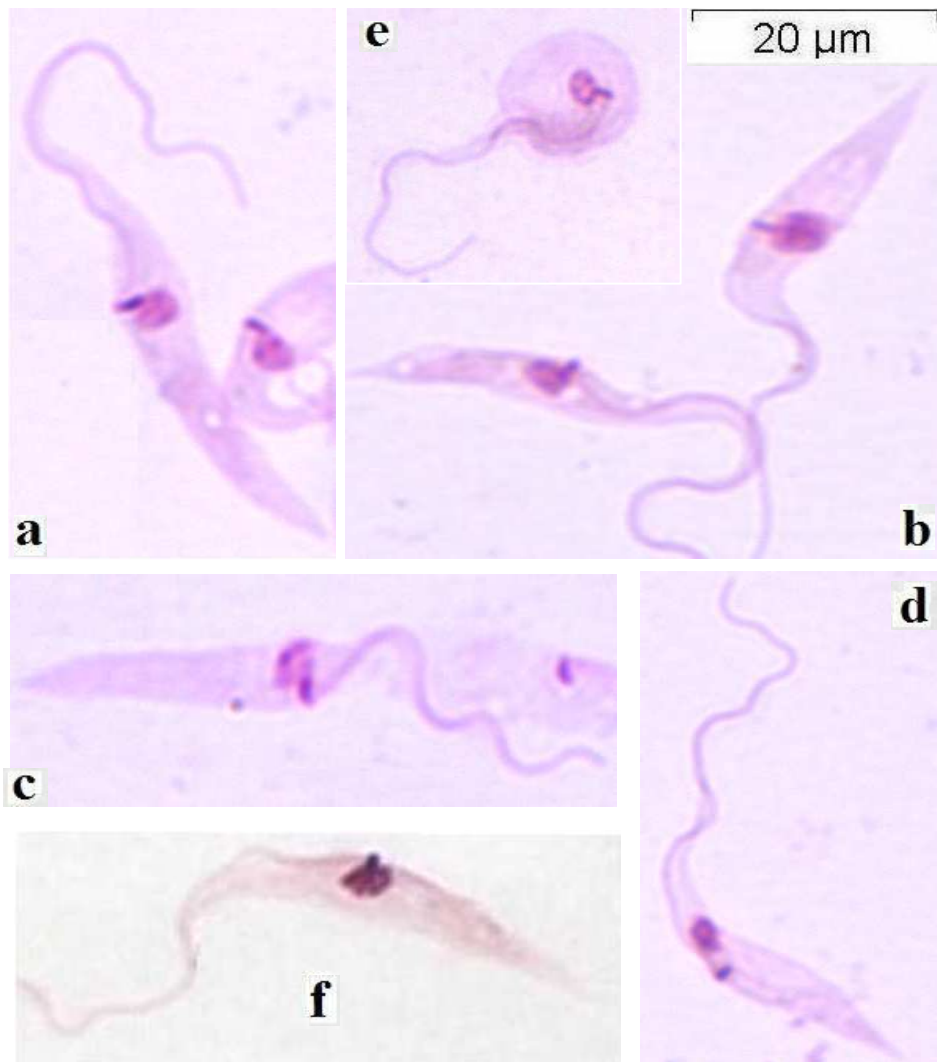


Figura1: Fotomicrografia dos estágios encontrados em cultura das amostras de *Trypanosoma* sp. estudadas. Observaram-se formas epimastigotas típicas (a, b, c), formas tripomastigotas (d) e formas esferomastigotas (e). Note a semelhança morfológica com *T. caninum* (f). (x 1000).

4.7. Eletroforese de enzimas

Empregou-se para esta análise 8 sistemas enzimáticos. O padrão eletroforético das 19 amostras de *Trypanosoma* sp. avaliadas, foram todos iguais entre si e com os padrões apresentados por *T. caninum* (amostra A27) e diferentes das amostras de *Trypanosoma cruzi* (Y e CL Brener), *Trypanosoma rangeli* (Choachi) empregadas nesta avaliação. Na figura 2, está demonstrado a posição esquemática dos 8 sistemas enzimáticos estudados e na figura 3 o perfil isoenzimático de 2 sistemas empregados nos 19 isolados obtidos de cães.

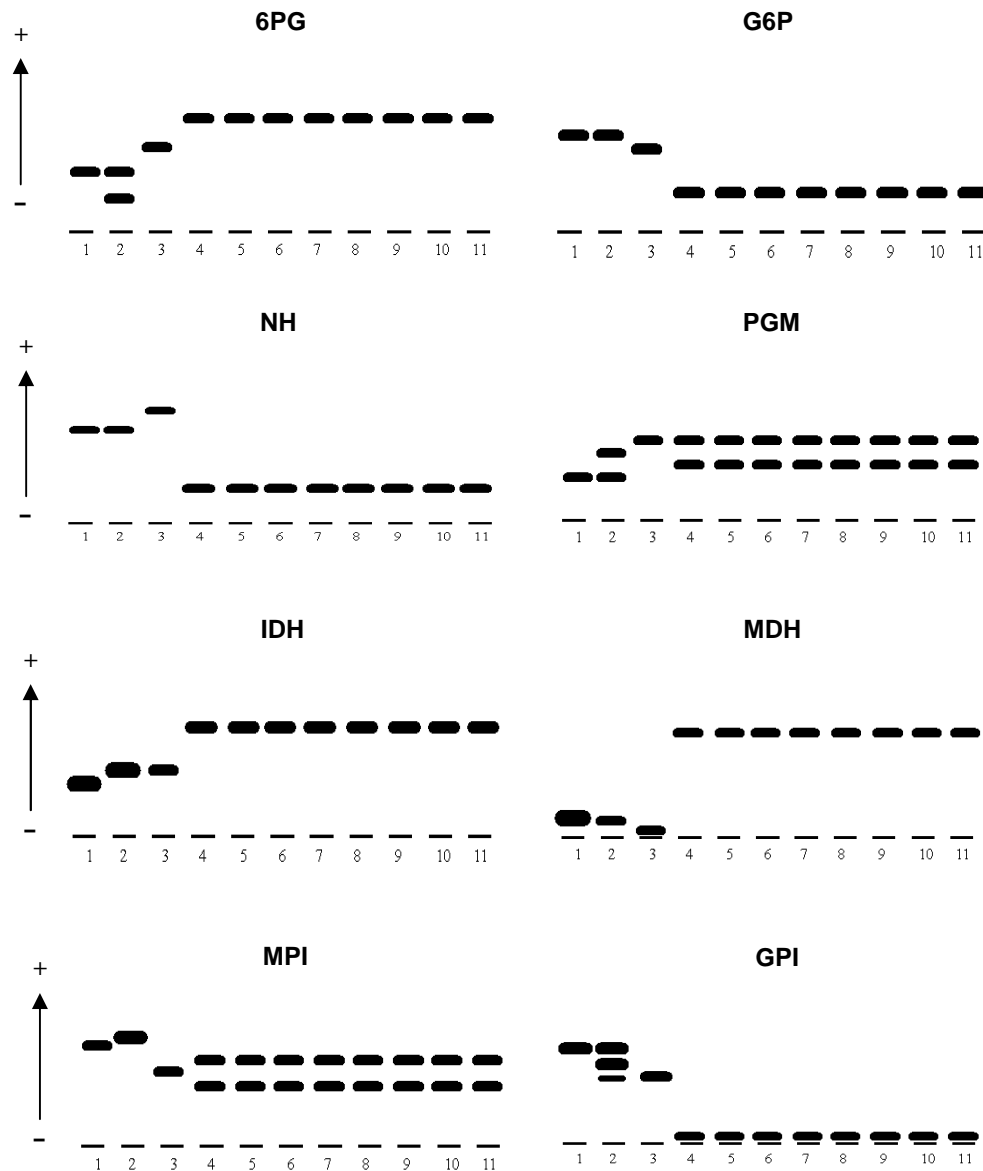


Figura 2: Representação esquemática dos padrões eletroforéticos de 7 das 19 amostras estudadas. 6PG (6-phosphogluconate dehydrogenase, E.C.1.1.1.44); G6P (glucose-6-phosphate dehydrogenase, E.C.1.1.1.49); NH (nucleotidase, E.C. 3.2.2.1); PGM (phosphoglucomutase, E.C.2.7.5.1); IDH (isocitrate dehydrogenase E.C.1.1.1.42); MDH (malate dehydrogenase, E.C.1.1.1.37); MPI (mannose phosphate isomerase, E.C. 5.3.1.8); GPI (glucose phosphate isomerase, E.C. 5.3.1.9). 1: *T.cruzi* (Y); 2: *T.cruzi* (CL Brener); 3: *T.rangeli* (Choachi); 4 - 10: isolados 3, 19, 20, 42, 53, 59 d 60; 11: *T.caninum* (amostra A27).

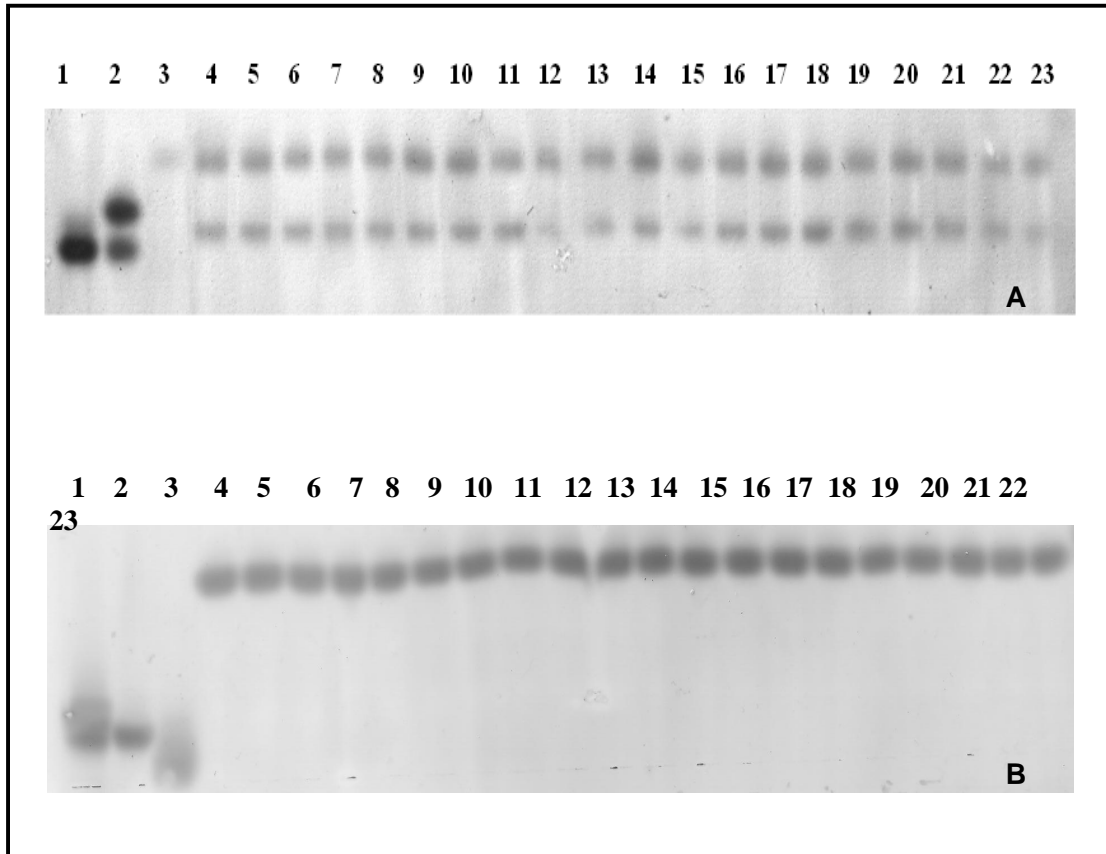


Figura 3: Perfil isoenzimático de 2 sistemas enzimáticos empregados nos 19 isolados obtidos de cães. **A:** PGM (phosphoglucomutase, E.C.2.7.5.1): 1: *T. cruzi* (Y); 2: *T. cruzi* (CL Brener); 3: *T. rangeli* (Choachi); 4 – 22: isolados de cães (3, 19, 20, 42, 53, 59, 60, 62, 118, 120, 176, 194, 201, 249, 259, 265, 271, 310, and 331); 23: *Trypanosoma caninum* (amostra A27). **B:** MDH (malate dehydrogenase, E.C.1.1.137): 1: *T. cruzi* (Y); 2: *T. cruzi* (CL Brener); 3: *T. rangeli* (Choachi); 4 – 22: isolados de cães (3, 19, 20, 42, 53, 59, 60, 62, 118, 120, 176, 194, 201, 249, 259, 265, 271, 310, and 331); 23: *Trypanosoma caninum* (amostra A27).

4.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Formas de cultura foram processadas para a pesquisa de DNA através da PCR empregando diferentes alvos moleculares. Em todos os sistemas avaliados, o padrão de amplificação das 19 amostras de *Trypanosoma* sp. estudadas foi igual ao padrão apresentado por *T. caninum* e diferente do padrão das amostras de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Utilizando primers genéricos para tripanosomatídeos (D75/76) obteve-se um produto de amplificação com cerca de 250bp em todas as amostras analisadas, assim como *T. caninum* (Figura 4 A, B). Utilizando primers que amplifica seqüências específicas de *T. cruzi* (D71/D72), nenhum produto de amplificação foi obtido para as amostras estudadas, *T. caninum* e *T. rangeli* (Figura 5 A,B). Da mesma forma, nenhum produto de amplificação foi observado quando se utilizou primers específicos para *T. rangeli* (R1/R2). Neste sistema, somente um produto de 450bp foi obtido com *T. rangeli* (Figura 6 A, B). Com primers 121/122, observou-se, em todas as amostras de *Trypanosoma* sp estudadas, amplificação de dois produtos: um de 330bp e outro com 350bp. Algumas das amostras, neste sistema, também apresentaram um produto de amplificação em torno de 760 pares (Figura 7 A, B).

Os fragmentos de pele foram processados pela PCR utilizando somente os primers 121/122 e R1/R2. Em ambos os sistemas, não houve amplificação de qualquer produto para todas as amostras processadas. O produto de extração dessas amostras, foram quantificadas em espectrofotômetro, apresentando a quantidade de DNA na faixa de 100 a 500 ng/ µl. O teste de inibição também foi verificado em todas as amostras de tecido, não apresentando qualquer interferente na reação.

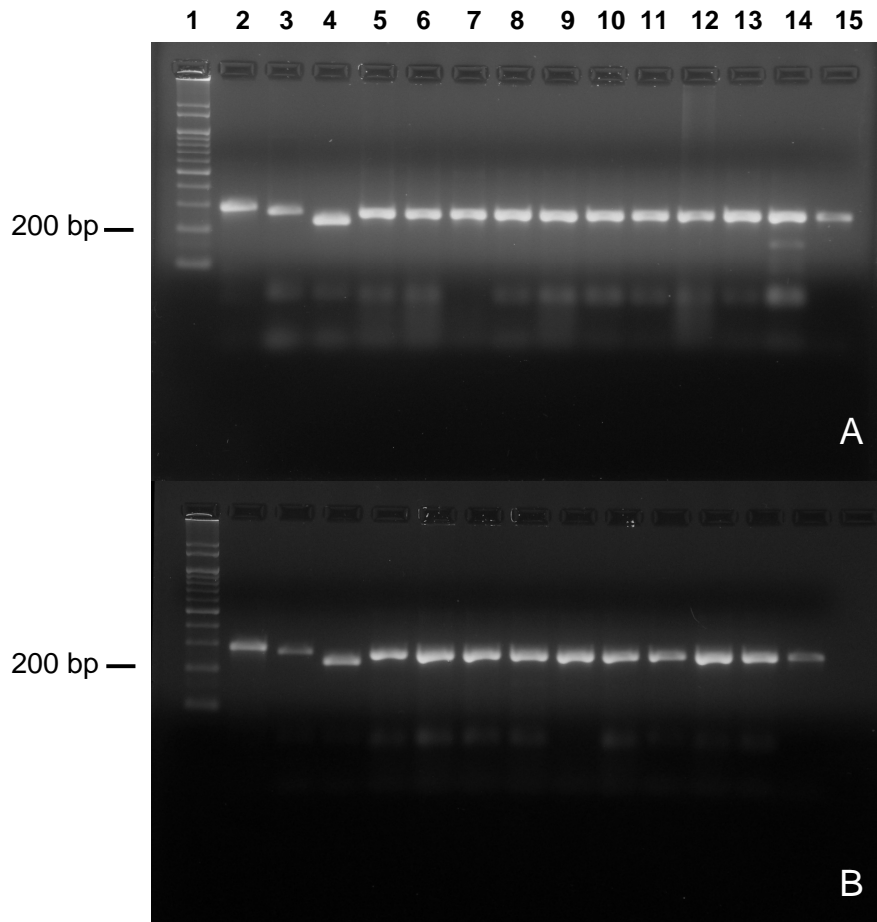


Figura 4: Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers D75/76. **A:** Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T. rangeli* (H14); 5 – 14 amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 15- *T. caninum* (amostra A27). **B:** Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T. rangeli* (H14); 5 – 13 amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 14- *T. caninum* (amostra A27); 15 – vazio.

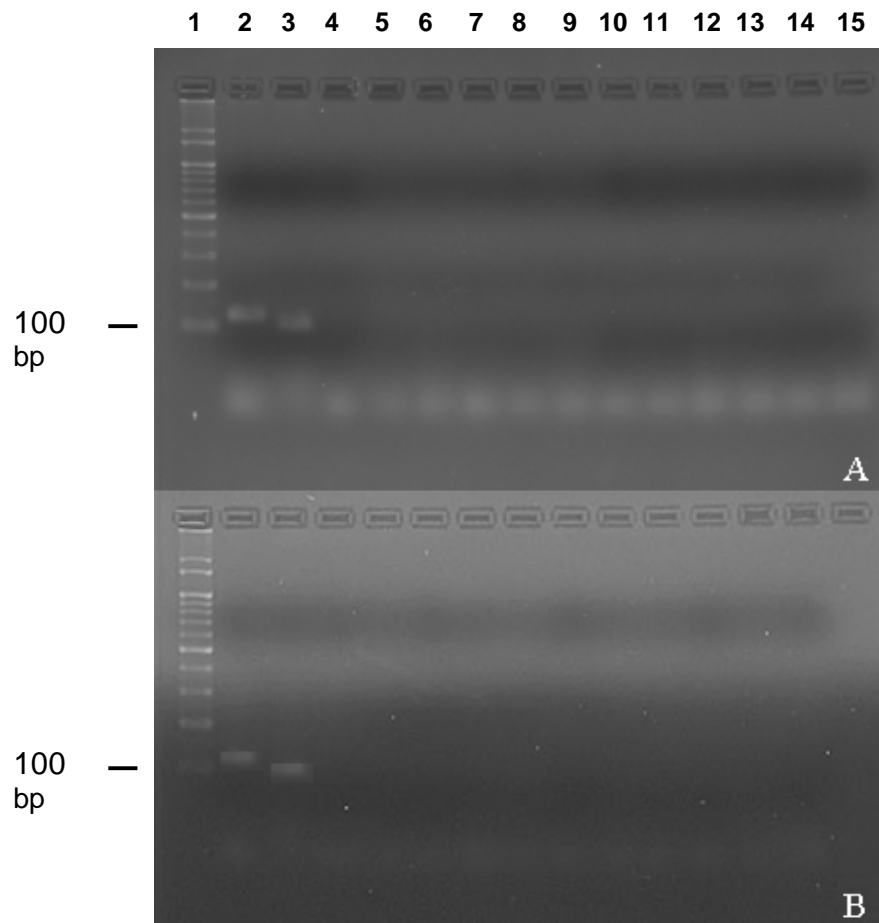


Figura 5: Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers D71/72. **A:** Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T. rangeli* (H14); 5 – 14 amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 15- *T. caninum* (amostra A27). **B:** Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T. rangeli* (H14); 5 – 13 amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 14- *T. caninum* (amostra A27); 15- vazio.

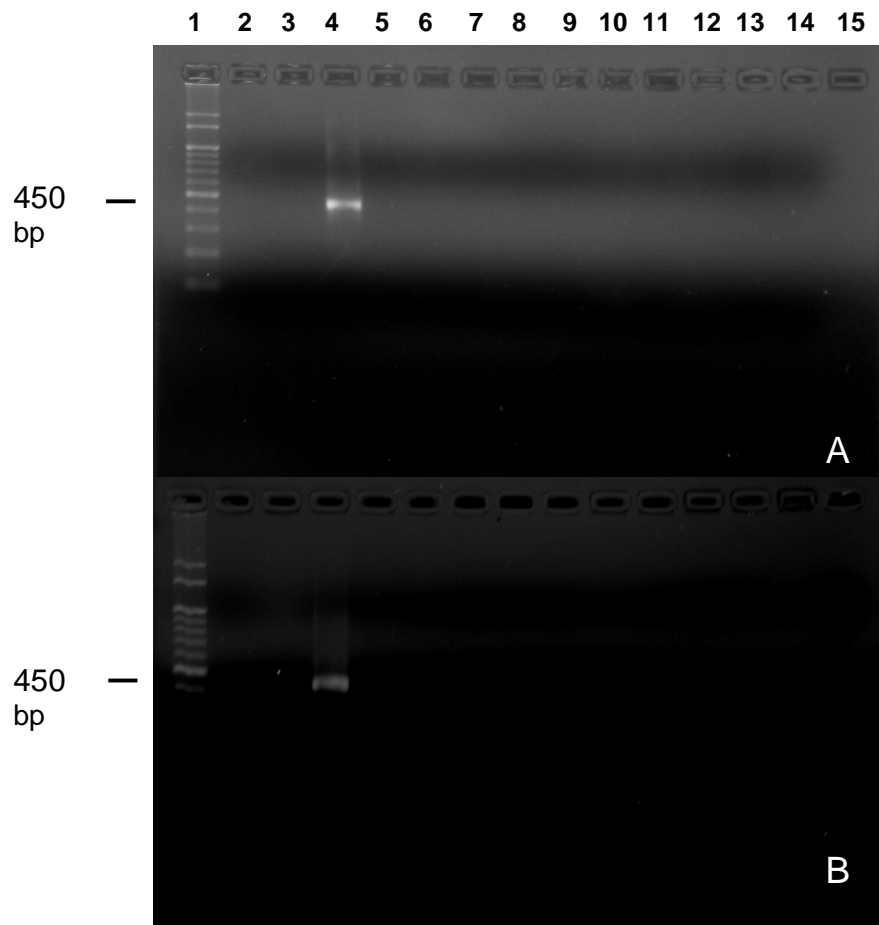


Figura 6: Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers R1/R2. **A:** Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T. rangeli* (H14); 5 – 14 amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 15- *T. caninum* (amostra A27). **B:** Slot 1- marcador 100 bp; 2- *T. cruzi* (Y); 3- *T. cruzi* (Dm28); 4- *T. rangeli* (H14); 5 – 13 amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 14- *T. caninum* (amostra A27); 15- vazio.

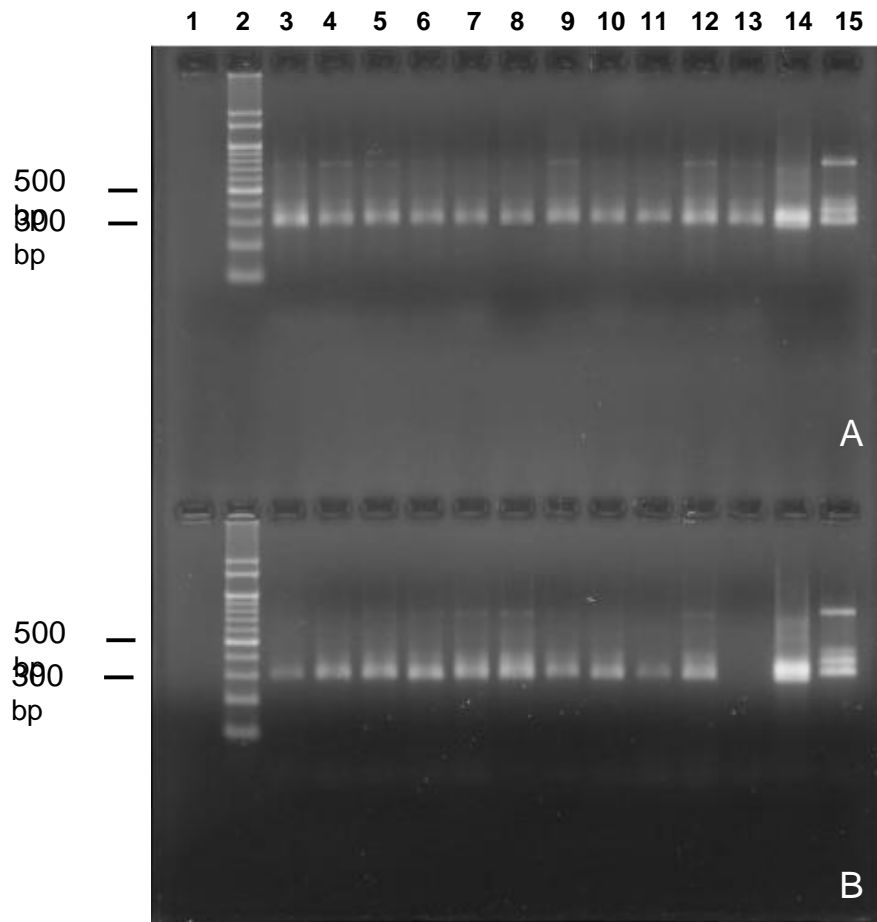


Figura 7: Produtos de amplificação com formas de cultura utilizando primers 121/122. **A:** Slot 1- vazio; 2- marcador 100 bp; 3- 12: amostra nº 3; 19; 20; 42; 53; 59; 60; 62; 118; 120; 13: *T. caninum* (amostra A27); 14: *T. cruzi* (Y); 15- *T. rangeli* (SC58). **B:** Slot 1- vazio; 2- marcador 100 bp; 3- 11: amostras nº 176; 194; 201; 249; 259; 265; 271; 310; 331; 12: *T. caninum* (amostra A27); 13: vazio; 14: *T. cruzi* (Y); 15- *T. rangeli* (SC58).

5. DISCUSSÃO

As Leishmanioses estão em franca expansão no Brasil, sendo cada vez mais comum a ocorrência de sobreposição de áreas endêmicas com ambas as formas da doença. No município do Rio de Janeiro, as Leishmanioses Tegumentar e Visceral são descritas em várias regiões, com inúmeros casos caninos identificados (MARZOCHI et al., 1985; MADEIRA et al., 2006b). O Ministério da Saúde recomenda que em áreas endêmicas de LV sejam realizados inquéritos sorológicos na população canina, visando identificar os animais sororeatores e a conseqüente eliminação dos mesmos, a partir da eutanásia, independente da condição geral ou da presença de sinais de LV (M. S., 2006).

A sobreposição de áreas endêmicas é fator complicador para o diagnóstico canino, visto que testes sorológicos, que constituem os métodos empregados nos inquéritos, não discriminam as duas formas da doença, as quais possuem medidas de controle diferenciadas para cães domésticos. Estudos prévios indicam que antígenos de diferentes espécies de *Leishmania* podem interferir nos testes sorológicos (DANTAS-TORRES et al., 2007).

A família Trypanosomatidae apresenta várias espécies de parasitas que infectam animais, alguns com expressiva importância em Saúde Pública como os parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Não se conhece em cães, no município do Rio de Janeiro, a presença de outros tripanosomatídeos, além dos parasitas do gênero *Leishmania*.

Recentemente, no município do Rio de Janeiro, foi descrita uma nova espécie do gênero *Trypanosoma*, identificado como *Trypanosoma caninum* (MADEIRA et al., 2009). Esta espécie foi isolada de um cão doméstico a partir do cultivo de fragmentos de pele integra. A princípio pensou-se que tal isolamento pudesse ter sido um fato ocasional, entretanto, outros isolados foram sendo obtidos nessa região, fazendo supor um possível ciclo entre os cães no município do Rio de Janeiro. A proposta deste estudo focou-se na identificação de 19 amostras de flagelados do gênero *Trypanosoma* que foram isoladas de cães, comparando-as principalmente com a amostra de *Trypanosoma caninum* recentemente descrita.

Todas as 19 amostras aqui estudadas apresentaram os mesmos padrões biológicos, bioquímicos e moleculares entre si e com a amostra de *Trypanosoma*

caninum, demonstrando que este novo parasita possa estar circulando entre os cães no município do Rio de Janeiro, o que poderá confundir o diagnóstico etiológico destes animais, durante os inquéritos para controle de LV, uma vez que tal diagnóstico é baseado em ferramentas sorológicas. Esta informação é reforçada, pelo fato de 50% dos animais estudados terem apresentado reatividade sorológica a antígenos de *Leishmania*, com títulos que variaram de 1:40 a 1:320. Esse resultado sugere uma possível reatividade cruzada entre ambos os parasitas.

Outra observação que reforça tal afirmação é o fato seis dos 20 cães estudados terem sido posteriormente encaminhados para eutanásia por terem apresentado reatividade sorológica para Leishmaniose e, conseqüentemente suspeitos de LV sem, no entanto, parasitas do gênero *Leishmania* terem sido isolado de nenhum desses animais. Apesar da IFI ser o método mais utilizado em inquéritos sorológicos e estudos epidemiológicos em diferentes áreas endêmicas, esta ferramenta não é capaz de discriminar as espécies de *Leishmania* e estudos já demonstraram reação cruzada com diferentes membros da família Trypanosomatidae (IJAGBONE et al., 1989; FEREC et al., 1990; DESQUENES et al., 2007; ROSYPAY et al., 2007; CABALLERO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2002) demonstrando que testes sorológicos são incapazes de identificar o agente causador da infecção, podendo causar confusões no diagnóstico.

Dos vinte animais estudados, três foram provenientes do bairro de Campo Grande, local de procedência do primeiro isolado de *T. caninum* (MADEIRA et al., 2009) e 17 do bairro de Guaratiba. Esse resultado demonstra a possível circulação desse parasita nos cães em diferentes regiões do município do Rio de Janeiro. O maior número de isolamentos obtidos no bairro de Guaratiba deve-se ao fato do projeto principal ter sido concentrado nessa região.

Os animais, tanto no momento do inquérito, como nas visitas domiciliares posteriores, apresentaram-se em bom estado clínico e dermatológico. Adicionalmente, os seis animais eutanasiados por suspeita de LV, também estavam em bom estados geral. Esta observação sugere que o parasita isolado possa não ser patogênico para os cães, como foi apontado por Madeira et al. (2009). Entretanto, cães com LV, podem apresentar-se assintomáticos por um longo período de tempo. No entanto, a compreensão de como este protozoário está sendo mantido e transmitido sob condições naturais ainda não é conhecido e este fato é de fundamental importância em diferentes aspectos.

Um fato interessante observado neste estudo e também verificado por Madeira et al. (2009) foi o isolamento exclusivo deste parasita em fragmentos de pele íntegra. Em um dos animais estudados o parasita foi isolado de dois sítios de pele (orelha e escápula) sugerindo que este parasita possa ser encontrado em diferentes áreas da pele do animal. A hemocultura realizada em 9 animais num primeiro momento e repetida em 5 animais num segundo momento, apresentaram resultados negativos, essa característica é incomum neste gênero, sugerindo que talvez este parasita possa ter preferência por habitar tecidos e vasos de circulação periférica. Isto também foi observado no animal onde ocorreu o isolamento de *T. caninum*.

Não se sabe se esse parasita pode se manter por longos períodos no animal. Em nosso estudo, 9 animais foram reavaliados e em somente um animal obteve-se o re-isolamento parasitário 6 meses após o isolamento inicial. A avaliação parasitológica feita um ano após em cinco animais, demonstrou resultados negativos em todas as situações, demonstrando que mesmo em animais previamente positivos o parasita não é reisolado com facilidade.

Em situação experimental, Madeira et al. (2009) demonstraram que *T. caninum* não foi capaz de evoluir em triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Neste estudo, realizamos o xenodiagnóstico diretamente em 5 cães, com *Rhodnius neglectus*, demonstrando também resultados negativos. Esses resultados podem sugerir que outros artrópodes atuem como vetores, como as pulgas e carrapatos, uma vez que esses ectoparasitas são amplamente distribuídos em muitas áreas e comumente possuem características de mudar de hospedeiro durante o ciclo de vida facilitando o potencial de transmissão de doenças (WILSON, 2002). Em áreas de LV, carrapatos têm sido suspeitos de participar na transmissão de *Leishmania chagasi* de cão para cão (COUTINHO et al., 2005). Entretanto, a competência de outros vetores, como mosquitos e flebotomíneos, deve ser investigada.

A manutenção, em cultura, de parasitas recém isolados é uma condição crucial para o seu estudo e processo de identificação. Todas as 20 amostras descritas neste estudo, com exceção de uma, que foi perdida, foram facilmente isoladas e cultivadas em diferentes meios axênicos apresentando, nesta condição, todas as formas evolutivas características do gênero *Trypanosoma* (HOARE, 1972). Morfologicamente apresentaram similaridade com *T. caninum*, embora a caracterização definitiva tenha sido feita por métodos bioquímicos e moleculares.

Todas as outras metodologias empregadas neste estudo, tais como a eletroforese de isoenzimas e a PCR, demonstraram o mesmo padrão entre as amostras estudadas e *T. caninum*, reforçando a identidade destes parasitas. Utilizando primers D75/76 descrito como genérico para membros da família Trypanosomatidae foi observado o mesmo produto de amplificação (250bp) em todos os isolados do estudo e idêntico ao isolado de *Trypanosoma caninum* (MADEIRA et al, 2009), diferente dos padrões apresentados por *T. cruzi* e *T. rangeli*. Um dado interessante foi ausência de amplificação quando se utilizou primers específicos para *T. cruzi* (D71/72) e primers específicos para *T. rangeli* (R1/R2), demonstrando com fortes evidências que trata-se de um novo isolado. Quando utilizamos primers 121/122, dois produtos foram obtidos com cerca de 330 e 350bp, tendo algumas amostras demonstrando também produto de amplificação de um fragmento de 760 bp. Amostras de *T. cruzi* apresentaram apenas um produto de amplificação de 330bp (VALLEJO et al., 1999).

Todos esses resultados foram confirmados por isoenzimas, que mostraram diferenças entre o perfil das bandas obtidas com as amostras estudadas, quando comparado com referências de *T. cruzi* e *T. rangeli* em todos os sistemas enzimáticos empregados.

A aplicação da PCR em fragmentos de pele, utilizando primers 121/122, não foi capaz de amplificar qualquer produto, sugerindo, talvez, que este parasita possa estar em baixos níveis neste órgão ao ponto de não serem detectados por este alvo. Resultados preliminares utilizando primers D75/D76, demonstraram o mesmo padrão de amplificação obtido com formas de cultura. Este resultado confirma a presença, pela PCR, do parasita em pele e sugere que outros alvos moleculares devam ser utilizados para esse fim. Tal resultado é de grande importância, visto que pode ser empregado no rastreamento molecular desse parasita em pele integra de cães.

Todas as ferramentas aplicadas neste estudo, não deixam dúvida que as 19 amostras estudadas, isoladas de cães no município do Rio de Janeiro puderam ser identificadas como *T. caninum*. Estes resultados foram submetidos à publicação e constituem um alerta para a vigilância epidemiológica no Programa de Controle das Leishmanioses no município do Rio de Janeiro, principalmente relacionado aos testes aplicados no diagnóstico canino. O conhecimento da presença deste parasita em cães é de grande importância e demonstra que outros estudos são necessários

para se conhecer elementos que possam estar contribuindo para a sua propagação e disseminação.

6. CONCLUSÕES

- i. Através das ferramentas aplicadas neste estudo, todas as 19 amostras de parasitas do gênero *Trypanosoma* estudadas, foram identificadas como *Trypanosoma caninum*, demonstrando a circulação desta espécie nos cães no município do Rio de Janeiro.
- ii. A pesquisa de DNA parasitário em fragmentos de pele demonstrou que alvos moleculares genéricos podem ser mais apropriados para esse fim.
- iii. Dos 20 cães dos quais isolou-se *T. caninum*, 50% demonstraram reatividade sorológica para Leishmaniose em diferentes níveis, demonstrando que meios para se obter diagnóstico diferencial confiável devem ser buscados.
- iv. Não houve isolamento parasitário em todas as hemoculturas realizadas, sugerindo que esta ferramenta possa não ser a ideal para isolamento deste protozoário.
- v. Todos os animais possuíam hábitos domiciliares e foram provenientes do município do Rio de Janeiro, de áreas de ocorrência da LV e LT, demonstrando não haver possibilidade de infecção desses animais em localidade fora do município do Rio de Janeiro.
- vi. Este achado em áreas de ocorrência da LV canina alertam para a necessidade de se estabelecer um diagnóstico preciso nesses animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida MA, Jesus EE, Souza-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127 (3 – 4): 227-32.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Hilbert JSL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 57(3):328-36.
- Anez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV A reconsideration of its systematic position. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1982; 77:405-415.
- Akpa PO, Ezeokonkwo RC, Eze CA, Anene BM. Comparative efficacy assessment of pentamidine isethionate and diminazene aceturate in the chemotherapy of *Trypanosoma brucei brucei* infection in dogs. *Veterinary Parasitology*. 2008; 151:139-49.
- Aquino LPCT. Importancia da Infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil. *Revista de Ciências Veterinárias*. 2007; 5:61-8.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal Parasitology*. 2000;30 (12-13):1269-81.
- Bengaly Z, Sidibe I, Ganaba R, Desquesnes M, Boly H, Sawadogo L. Comparative pathogenicity of three genetical distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Veterinary Parasitology*. 2002; 108:1-19.
- Boulhosa J. Informação científica. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.1946. p21-26.
- Caballero ZC, Souza OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*.2007;14(8): 1045-49.
- Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürther RE. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Tropical Medicine and Parasitology*. 1998; 92(6):671-83.
- Cohen JE, Gürtler RE. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science*. 2001;293:694-98.
- Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linard PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the

- epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*.2005; 128: 149–155.
- Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Anez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Tropica*. 2006; 98(3):247-54.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.1994; 50: 296–311.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoir of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. *Veterinary Parasitology*.2007; 149: 139–46.
- D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herptosoma) rangeli*, Tejera, 1920. In *The Biology of the Kinetoplastida*. (ed. Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A.) Academic Press, New York. 1976: 327-403.
- Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. 1955;47(1):75-87.
- Desquesnes M, Bosseno MF, Brenière SF. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2007;7:457-62.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):1-12.
- De Carli GA. *Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 291-312.
- Dias JCP, Macedo AO. Doença de Chagas. In: José Rodrigues Coura. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2005. p 557-93.
- Evans TG, Teixeira MJ, Mc Auliffe IT, Vasconcelos AW, Souza Ade A, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992;166(5):1124-32.
- Ferenc SA, Stopinski V, Courtney CH. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a sero-epidemiological survey in the eastern Caribbean basin. *International Journal for Parasitology*. 1990; 20:51-6.

- Fernandes O, Santos SS, E Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;95(1):97-9.
- Franke CR, Greiner M, Mehlitz D. Investigation on naturally occurring *T.evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Tropica*. 1994; 58:159-69.
- Gillingwater K, Büscher P, Brun R. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. *Veterinary Parasitology*. 2007; 148:114-21.
- Gonçalves TCM, Rocha DS, Cunha RA. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 2000;34(4):348-52.
- Gonçalves CCM, Reiche EMV, Abreu Filho BA, Silveira TGV, Felizardo TC, Maia KR, Curta RC, Padovese EJ, Dias Filho BP, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of american tegumentar leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 66 (1): 91-102.
- Gow AG, Simpson JW, Picozzi K. First report of canine African trypanosomosis in the UK. *Journal of Small Animal Practice*. 2007;48:658-61.
- Grisard, E. C. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2002;1(1):5.
- Gurgel-Goncalves R, Ramalho ED, et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2004;46(6):323-30.
- Harrus S, Harmelin A, Presenty B, Bark H. *Trypanosoma congolense* infection in two dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 1995;36:83-86.
- Herrera HM, Norek A, Freitas TPT, Rademaker V, Frenandes O, Jansen AM. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristin area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitology Research*. 2005; 96(2):121-26.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999; 354 (9185):1191-9.
- Hoare, C. A. The Trypanosomes of Mammals. A zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972:555-93.
- Hooft EM't. Canine African trypanosoma. *Journal of Small Animal Practice*. 2008;49:487.

- Horchner F, Zillmann U, Metzner M, Schonefeld A, Mehlitz D. West African dogs as a model for research on trypanotolerance. *Tropical Medical Parasitology*. 1985; 36:257-58.
- Ijagbone IF, Staack C, Reinhard R. Fractionation of trypanosome antigens for species-specific sero-diagnosis. *Veterinary Parasitology*. 1989; 78:278-79.
- Lorosa ES, Valente MVMP, Cunha V, Lent H; Jurberg J. Source of Chagas disease in Arcadia, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(7):885-7.
- Madeira MF, Serra CMB, Schubach TMP, Pereira S, Figueredo FB, Soares M, et al. Co-infecção natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma* sp. em cão doméstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004; 37:217.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. 2006a; 100(5): 442-45.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira SA, Figueredo FB, Baptista C, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2006 b; 138:366–370.
- Madeira MF, Barros JHS, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, De Paula CC, et al. *Trypanosoma caninum* n.sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*. 2009;16:1-13.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimaldi GJr, Momen, H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977–1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1985; 80: 349–57.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*. 1994; 10(1):37-40.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Publica*. 1994;10(2):359-75.
- Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978;272(5656):819-21.

Montenegro VM, Jiménez M, Pinto Dias JC, Zeledón R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(4):491-94.

M.S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. Ministério da Saúde – MS (ed), Brasília. 2006.

Njiru ZK, Ndung'u K, Matete G, Ndungu JM, Gibson WC. Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in animals from sleeping sickness foci in East Africa using the serum resistance associated (SRA) gene. *Acta tropica*. 2004; 90:249-54.

Nunes VLB, Oshiro ET. *Trypanosoma evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;84:692.

Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ES, Ishikawa E, et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001; 34(3):299-300.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimald GJ, Pontes-de Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;55(1):39-44.

Pepin J, Meda HA. The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. *Advances In Parasitology*. 2001; 49:71-132.

Pifano F, Peñalver LM, Medina R, Dominguez E. La infección natural del perro por el *Trypanosoma rangeli*. Primeira comprobación de um reservorio extrahumano vertebrado del protozoário em la natureza. *Gazeta Médica*. 1948; 56: 130-34.

Pinho AP, Goncalves TCM, Mangia RH, Russell NSN, Jansen AM. The occurrence of *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in the state of Rio de Janeiro, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93(2):141-3.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, et al. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta tropica*. 2002; 84:189-98.

Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001a. p. 161-76.

Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001b. p. 200-13.

- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;61(4):530-41.
- Rosypal AC, Cortés-Vecino JÁ, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Veterinary Parasitology*. 2007; 149:172-77.
- Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IMN, et al. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanosoma) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100(7):739-41.
- Seild AF, Moraes AS, Silva RAMS. A financial analysis of alternative strategies for treatment of *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Preventive Veterinary Medicine*. 1998; 33:219-43.
- Shaw JJ, Lainson R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1972; 66:25-32.
- Silveira FT, Ishikawa E A, De Souza AA, Laison R.. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002;9(1):43-50.
- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996;91(6):671-83.
- Silva RAM, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Embrapa; 2002. p. 141.
- Souza AI, Paulino-Junior D, Souza MG, Camacho AA. Aspectos Clínicos-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*. 2008; 38(5):1351-56.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerron J, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118(4): 1301-1310.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993; 62: 45–52.
- Souto RP, Vargas N; Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Experimental Parasitology*. 1999;91:306–14.

Tilley LP, Smith Jr FWK. Consulta Veterinária em 5 Minutos Espécies Canina e Felina. 2 ed. São Paulo: Manole Ltda; 2003.p.538.

Vargas N, Souto RP, Carranza JC, Vallejo GA, Zingales B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. *Experimental Parasitology*.2000; 96:147–59.

Vallejo GA., Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vetor and mammalian host by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*.1999;72(2):203-12.

Vickerman, K. The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the Kinetoplastida*; Lumsden 1976. p.1-34.

Wilson ME. Prevention of tick-borne diseases. *The Medical Clinics of North America*. 2002; 86: 219–238.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Americal Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.1994; 51: 771–77.

W.H.O, 2007. [acesso em 19 de dez de 2008] Disponível em:<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>

W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniasis. Technical Report Series. 2008: 793.