



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

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

ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA

OCORRÊNCIA DE *Leishmania chagasi* E OUTROS  
TRIPANOSOMATÍDEOS EM CÃES DE CUIABÁ, MATO GROSSO:  
AVALIAÇÃO CLÍNICA E USO DE DIFERENTES MÉTODOS DE  
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

RIO DE JANEIRO  
2012

OCORRÊNCIA DE *Leishmania chagasi* E OUTROS  
TRIPANOSOMATÍDEOS EM CÃES DE CUIABÁ, MATO GROSSO:  
AVALIAÇÃO CLÍNICA E USO DE DIFERENTES MÉTODOS DE  
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA

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

Orientado por Maria de Fatima Madeira e Valéria Régia Franco Sousa

Rio de Janeiro  
2012

ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA

OCORRÊNCIA DE *Leishmania chagasi* E OUTROS  
TRIPANOSOMATÍDEOS EM CÃES DE CUIABÁ, MATO GROSSO:  
AVALIAÇÃO CLÍNICA E USO DE DIFERENTES MÉTODOS DE  
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

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

Orientadores: Dra. Maria de Fatima Madeira  
Dra. Valéria Régia Franco Sousa

Banca examinadora

---

Dr. Fabiano Borges Figueiredo (Presidente) IPEC/Fiocruz

---

Dr. Rodrigo Caldas Menezes (Componente) IPEC/Fiocruz

---

Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bonfim (Componente) UFRRJ

---

Dra. Cibele Baptista (Componente) Biomanguinhos/Fiocruz

---

Dra. Flavia Coelho Ribeiro (Componente) EPSJV/Fiocruz

---

Dr. Sandro Antônio Pereira (Suplente) IPEC/Fiocruz

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo cuidado e sustento.

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Maria da Glória Ferreira pelo exemplo, dedicação e amor. Aos meus avós por serem o esteio da família e aos meus irmãos pela convivência e ajuda.

As minhas orientadoras, Dra. Maria de Fatima Madeira e Prof. Dra. Valéria Régia Franco Sousa. Obrigada pelos ensinamentos, orientação, carinho e dedicação. Agradeço imensamente a Deus pela benção de poder conhecê-las e conviver com vocês, pois apesar de personalidades diferentes, são exemplos que guardarei por toda minha vida.

Ao Médico Veterinário Dr. Fabiano Borges Figueiredo pelo “ponta pé inicial” e auxílio no decorrer do doutorado.

As amigas, companheiras de residência, mestrado e doutorado: Eveline da Cruz Boa Sorte, Wilma Neres, Mariana de Medeiros Torres, Thaís Ruiz, Magyda Arabia Araji Dahroug, Daphine Ariadne Jesus de Paula, Isadora Vila, Naiani Domingos Gasparetto, Glaucenyra Cecília Pinheiro, pelos momentos de descontração, gargalhadas, trabalho árduo e, por que não mencionar, tristezas ao longo de todos esses anos.

Aos Médicos e Médicas Veterinárias Maria Fernanda Aranega Pimentel, Eveline da Cruz Boa Sorte, Magyda Arabia Araji Dahroug, Naiani Domingos Gasparetto, Felipe Augusto Constantino Seabra da Cruz, Givago Silva Faria e ao técnico Valdir Campos pelo auxílio no trabalho de campo, tornando-as mais fáceis e prazerosas!!!!!!

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Leishmanioses (HOVET-UFMT): Juliana Yuki Rodrigues, Nayara Benites Moreira, Pamela Hensi, Álvaro Felipe pelo auxílio no trabalho de campo e laboratorial.

Ao Prof. Dr. Luciano Nakazato e a Profa. Dra. Valéria Dutra, estagiários, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, nos nomes de Marcelo Marques da Silveira, Isabela de Godoy, João Xavier, Carla Patrícia Amarante e Silva, Janaina Marcela Assunção Rosa, em especial a Daphine Ariadne Jesus de Paula, pela amizade e por toda ajuda no desenvolvimento do projeto.

A Profa. Adriane Jorge Mendonça e membros do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Maria do Carmo Aragão, Laura Cristina Araújo, Isadora Vila, Vanessa Suzila, Felipe Jaune, por terem proporcionado o desenvolvimento do projeto ao ceder espaço no laboratório, e acima de tudo pela ajuda, companhia, risadas.

A equipe HOVET-UFMT, membros do setor administrativo (Rosiane, Taislayne, Ana Rita, Ravi), técnicas de enfermagem (Edna, Regina, Anália, Marlene), técnicos (Domingas, Juarez, Gisele, Suen, Ramirie), mestrandos, residentes, estagiários, pessoal do serviço geral (Joilson, Edinéia) que sempre me ajudaram, proporcionando ambiente familiar, composto de muita solidariedade, fraternidade e alegria. Obrigada por tornarem meus dias mais alegres!!!!!!!!!!

Aos membros do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses e Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do IPEC/FIOCRUZ pelo auxílio na execução deste projeto.

Ao IPEC/FIOCRUZ e FAPEMAT pelo apoio financeiro.

Em especial a todos **os proprietários e seus cães (meus pacientes)** que gentilmente aceitaram participar deste projeto. A receptibilidade e o carinho com que fomos recebidos são motivações a continuar trilhando o caminho da pesquisa.

A todos que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto, seja por auxílio laboratorial, científico, palavras de apoio, incentivo, pois sei que sem a ajuda de vocês essa tese não teria chegado ao final. A vocês meu **MUITO OBRIGADA!!!**

Almeida, ABPF. **Ocorrência de *Leishmania chagasi* e outros tripanosomatídeos em cães de Cuiabá, Mato Grosso: avaliação clínica e uso de diferentes métodos de diagnóstico laboratorial.** Rio de Janeiro, 2012. 147 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

Na cidade de Cuiabá, o conhecimento de aspectos da leishmaniose visceral canina (LVC) é ainda muito escasso, apesar de casos humanos serem relatados nessa cidade. Este estudo objetivou avaliar clinicamente e por diferentes métodos laboratoriais cães domésticos domiciliados em áreas urbana e rural, no município de Cuiabá, Mato Grosso. Os animais foram selecionados por meio de busca ativa em cinco bairros e por demanda espontânea durante atendimento no hospital veterinário da UFMT. Os cães foram avaliados por ferramentas sorológicas, parasitológicas e moleculares, empregando diferentes amostras biológicas. Dos 430 cães obtidos por busca ativa, 95 (22,1%) foram reatores pela imunofluorescência indireta. Esse dado foi considerado para análise dos fatores de risco e, tanto aspectos relacionados ao hábito dos animais (livre acesso à rua e função de guarda), assim como do ambiente (rural e presença de plantações) foram considerados como fatores de risco importantes para a aquisição da infecção canina. A cultura parasitológica, utilizando amostras dos 430 cães oriundos do inquérito epidemiológico e 52 do atendimento no HOVET-UFMT, permitiu o isolamento de *L. chagasi* em 54 (11,2%) cães. A pele intacta foi a melhor amostra biológica de isolamento do parasito em cães sintomáticos, porém nos cães assintomáticos, a melhor amostra para isolamento foi a medula ósea. Por PCR, utilizando apenas os cães da busca ativa, DNA de *L. chagasi* foi detectada em diferentes amostras biológicas, diagnosticando 63 (14,6%) dos cães. O aspirado de linfonodo foi a melhor amostra para diagnosticar leishmaniose, pela PCR, independente do status clínico dos animais. O protozoário *Trypanosoma caninum* foi isolado exclusivamente de pele íntegra em 14 cães, demonstrando a presença desta espécie pela primeira vez em Cuiabá. Nossos resultados sugerem que a infecção por esse parasito, possa ser transitória e curar sem sinais clínicos específicos. Além de *T. caninum*, a infecção por *T. cruzi* em um cão foi também descrita na cidade de Cuiabá. Os resultados apresentados neste estudo contribuem para o conhecimento de aspectos da LVC em Cuiabá. Esta cidade possui características propícias para a instalação da leishmaniose visceral, sendo necessária inclusão de ações educacionais e sanitárias. Com relação ao diagnóstico canino, enfatizamos que a utilização de diferentes amostras clínicas, associadas a diferentes técnicas laboratoriais, proporcionam um diagnóstico acurado da LVC e auxiliam o diagnóstico diferencial com outros agentes que estejam circulando nesses animais. A infecção por *L. chagasi*, *T. caninum* e *T. cruzi* diagnosticados em cães domiciliados em Cuiabá demonstram a sobreposição de tais agentes, constituindo dados importantes para a vigilância epidemiológica nessa região.

**Palavras-chave:** *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma caninum*, *Trypanosoma cruzi*, cão, diagnóstico, Cuiabá, Mato Grosso

Almeida, ABPF. **Occurrence of *Leishmania chagasi* and other trypanosomatids in dogs in Cuiabá, Mato Grosso: clinical evaluation and use of different methods of laboratory diagnosis.** Rio de Janeiro, 2012. 147f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

In Cuiabá, knowledge of aspects of canine visceral leishmaniasis (CVL) is still very scarce, although human cases are reported. This study evaluated clinically and by laboratory methods, domestic dogs from urban and rural areas in the city. The animals were selected through active search in the five boroughs and spontaneous demand for care at the veterinary hospital (UFMT). The animals were evaluated by serological, parasitological and molecular approach, using different biological samples. Of the 430 dogs from active search, 95 (22.1%) were reactive in indirect immunofluorescence. These data were considered for analysis of risk factors and both aspects related to the habit of animals (free street access and guard function). The environment (rural and presence of agricultural activities) were considered important risk factors for acquisition of canine infection. The parasitological culture, from 430 dogs from an epidemiological survey and 52 treated at HOVET-UFMT, allowed the isolation of *L. chagasi* in 54 (11.2%) dogs. Intact skin was the best biological sample isolation of the parasite in symptomatic dogs, however, in asymptomatic dogs, the best biological sample for isolation was bone marrow. For PCR, DNA *L. chagasi* was detected in 63 (14.6%) animals, using different biological samples from dogs search active. The lymph node aspirate was the best biological sample to diagnose leishmaniasis by PCR, regardless of the clinical status of the animals. The protozoan *Trypanosoma caninum* was isolated exclusively intact skin in 14 dogs, demonstrating the presence of this species for the first time in Cuiabá. Our results suggest that infection by *T. caninum* can be transient and occur without specific clinical signs. Besides *T. caninum*, infection with *T. cruzi* in a dog was also reported in the city of Cuiabá. The results presented in this study contribute to the knowledge of aspects of LVC in Cuiabá. This city has favorable characteristics for the installation of visceral leishmaniasis, necessitating the inclusion of education and health actions. Regarding the diagnosis canine, we emphasize that the use of different clinical samples associated with different laboratory techniques, provide an accurate diagnosis of CVL and assist the differential diagnosis with other agents that are circulating in these animals. Infection with *L. chagasi*, *T. caninum* and *T. cruzi* diagnosed in pet dogs in Cuiabá demonstrate the overlap of these agents, providing important data for epidemiological surveillance in the region.

**Keywords:** *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma caninum*, *Trypanosoma cruzi*, dog, diagnostic, Cuiabá, Mato Grosso

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- CanL** – *Canine Leishmaniasis* / Leishmaniose canina  
**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais  
**DNA** – *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucléico  
**DPP** – *Dual Path Plataforma* / Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma  
**ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* / Ensaio imunoenzimático  
**g** – grama  
**HOVET-UFMT** – Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso  
**IFI** – Imunofluorescência Indireta  
**IPEC/FIOCRUZ** – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz  
**kDNA** – *Kinetoplast Deoxyribonucleic acid* / DNA do cinetoplasto  
**LAPCLIN-DERMZOO** – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos  
**LT** – Leishmaniose Tegumentar  
**LV** – Leishmaniose Visceral  
**LVC** – Leishmaniose Visceral Canina  
**ml** - mililitro  
**MS** – Ministério da Saúde  
**MLEE** - *Multi-locus enzyme electrophoresis* / Eletroforese de isoenzimas  
**NNN** – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal  
**OR** – *Odds ratio* / Razão de chances  
**PCR** – *Reaction chain polymerase* / Reação em Cadeia da Polimerase  
**rDNA** – *Ribosomal Deoxyribonucleic acid* / DNA ribossomal  
**rpm** – rotações por minuto  
**RS** – Rio Grande do Sul  
**SC** – Santa Catarina  
**Sin** – Sinonímia  
**UFMT** – Universidade Federal de Mato Grosso  
**VigiLeish** – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses  
**WHO** – *World Health Organization* / Organização Mundial da Saúde



## **LISTA DE FIGURA E TABELAS**

Figura 1. Localização espacial dos bairros pesquisados para a ocorrência de leishmaniose visceral canina na cidade de Cuiabá, Mato Grosso.	<b>27</b>
Figura 2. Fluxograma apresentando as etapas do estudo, identificando as amostras biológicas coletadas dos animais e os ensaios laboratoriais empregados nas análises	<b>33</b>
Tabela 1: Especificação dos alvos moleculares que foram utilizados neste estudo	<b>30</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES .....	2
1.2. AS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE MATO GROSSO.....	3
1.3. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) .....	5
1.4. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	8
1.5. FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AS LEISHMANIOSES.....	10
1.6. TRIPANOSOMATÍDEOS DE OCORRÊNCIA EM CÃES DOMÉSTICOS .....	11
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1. DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ALVO.....	19
4.2. ÁREA DE ESTUDO .....	19
4.3. ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS .....	20
4.4. ENSAIOS EMPREGADOS NO ESTUDO .....	22
4.4.1. <i>Testes sorológicos</i> .....	22
4.4.2. <i>Isolamento parasitário em meio de cultura</i> .....	22
4.4.3. <i>Exame citológico</i> .....	23
4.4.4. <i>Testes moleculares</i> .....	23
4.4.5. <i>Sequenciamento molecular</i> .....	24
4.4.6. <i>Eletroforese de enzimas (MLEE)</i> .....	25
4.5. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	26
4.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	27
4.7. PROCEDIMENTO ÉTICO .....	28
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 - ARTIGO 1 .....	30
5.2 - ARTIGO 2 .....	37
5.3 - ARTIGO 3 .....	43
5.4 - ARTIGO 4 .....	61
5.5. ARTIGO 5 .....	81
5.6. ARTIGO 6 .....	103
<b>6. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>116</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>124</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>125</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>143</b>
9.1. LICENÇA CEUA .....	143
9.2. FICHA EPIDEMIOLÓGICA .....	145

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais das Leishmanioses

Leishmaniose compreende uma entidade de doenças causadas por protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, que acometem o homem e diferentes espécies de animais. A doença ocorre em regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, causando duas formas clínicas principais, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV) (WHO, 2012).

Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que 1,0 a 1,5 milhões de casos de LT e 500 mil novos casos de LV ocorram por ano. A população sob risco de leishmaniose é estimada em 350 milhões de pessoas, afetando 88 países, dos quais 72 são classificados como países em desenvolvimento, incluindo 13 dos países menos desenvolvidos. Dos casos de LV diagnosticados, mais de 90% ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2012).

A LV, no Brasil é descrita desde 1913 e possui como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (sin. *L. (L.) infantum*). É uma doença crônica, de caráter endêmico, caracterizada principalmente por emagrecimento progressivo, anemia, episódios febris e hepatoesplenomegalia, cuja severidade depende normalmente do tempo de evolução da doença. Em território brasileiro é registrada em 21 das Unidades da Federação, atingindo as cinco regiões brasileiras (MS, 2012c). Recentemente, na região sul do país, onde não havia registro da doença, foram relatados casos caninos autóctones na cidade de São Borja (RS), demonstrando a expansão da doença (Souza et al., 2009a; MS, 2010a). No período de 2006 a 2010 foram registrados 18.168 casos de LV no país com 1083 óbitos, sendo a região nordeste (47,1%) e norte (18%) as regiões com maior registro de casos (MS, 2012b; MS, 2012d).

O ciclo de transmissão da LV envolve canídeos (silvestres e domésticos), marsupiais e roedores, como principais reservatórios. O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor nas Américas (Dantas-Torres et al., 2012), no entanto, *L. cruzi*, *L. evansi* e *L. migonei* têm sido propostos como potenciais vetores de *L. chagasi* em países sul americanos, incluindo o Brasil (Souza et al., 2003; Carvalho et al., 2010; Salomon et al., 2010; Missawa et al., 2011; Dantas-Torres et al., 2012). Atualmente, a doença encontra-se urbanizada, ocorrendo em grandes cidades, mantidas principalmente pela presença de cães infectados e flebotomíneos adaptados a estes ambientes (Silva et al., 2001; Marzochi et al., 2009). Acredita-se que *L. chagasi* tenha sido introduzida no país durante a colonização européia, através de cães infectados e aqui tenha se adaptado a novos vetores e hospedeiros (Shaw, 2002). Tal hipótese está baseada na semelhança genética, bioquímica e molecular entre *L. infantum* e *L. chagasi* (Momen et al., 1993; Mauricio et al., 1999). Recentemente estudos utilizando tipagem de multilocus por microssatélites apoiam esta hipótese (Kuhls et al., 2011; Leblois et al., 2011).

## **1.2. As Leishmanioses no Estado de Mato Grosso**

Em Mato Grosso a LV possui caráter endêmico, sendo os primeiros registros da doença humana realizados na década de setenta na região sudeste do estado (Baruffa e Cury, 1973). No início da década de noventa em municípios da região centro-sul foram registrados mais quatro casos autóctones (Hueb et al., 1996). A demonstração da expansão da LV por todo o estado e principalmente para a capital e municípios próximos ocorreu a partir de 1998, após o diagnóstico de um paciente de Várzea Grande, cidade vizinha à Cuiabá (Camiá et al., 1999). Trabalho realizado por Mestre e Fontes (2007) descreve a expansão e aumento da doença no estado, com 34 municípios notificados com doença e 138 novos casos humanos no período de 1998 a 2005.

Mato Grosso é considerado região endêmica tanto para LV quanto para LT, apresentando aumento no número de notificação de ambas as doenças. Em 2010 foram notificados 54 casos de LV e 2466 de LT (MS, 2012a; MS, 2012b). Cuiabá é considerada área de transmissão moderada para LV, sendo registrados 22 casos humanos no período de 2005 a 2011, com relato de um óbito (CCZ, 2012).

Pela severidade da LV no homem, as ações sanitárias para esta forma da doença são mais rigorosas que aquelas direcionadas à forma tegumentar. Assim, programas de controle são implantados nas áreas endêmicas, objetivando interromper o ciclo de transmissão. Tais programas assumem três pontos principais: diagnóstico e tratamento dos casos humanos; monitoramento da fauna flebotômica e detecção de casos caninos, realizando eutanásia dos animais sororeatores (MS, 2006). No Brasil, estes programas iniciaram-se por volta da década de 50 durante um surto ocorrido no Estado do Ceará, estendendo-se mais tarde para outras regiões do país. No estado de Mato Grosso, o primeiro inquérito sorológico canino foi realizado em Cuiabá, em 1999, onde se observou índices de prevalência de 64,5% dos cães (Moura et al., 1999). Mestre e Fontes (2007) ao analisarem dados de inquéritos caninos realizados em áreas urbanas e periurbanas de 49 municípios de Mato Grosso, no período de 1998 a 2005, relataram uma prevalência de 9% nos 40.000 cães testados. O município de Jaciara foi o que apresentou maior prevalência (40%) e em Cuiabá, verificou-se 8,4% dos cães positivos.

A partir destes estudos, pesquisas visando identificar a prevalência da infecção canina, da fauna flebotômica e agente etiológico, além da ocorrência de casos humanos vêm sendo realizados no estado de Mato Grosso. A soroprevalência de cães infectados tem sido variável, dependendo do período e área estudada. São descritos índices de 3,4%; 26,8% a 48,4% em áreas com registros de aumento do número de casos (Almeida et al., 2009; Duarte, 2010; Mestre et al., 2011). Missawa et al. (2010) demonstraram infecção de *L.*

*longipalpis* por *L. chagasi* em Várzea Grande, município considerado de transmissão intensa no ano de 2003 (MS, 2006). Entretanto, *L. cruzi* tem sido a espécie mais prevalente em diversas áreas endêmicas de LV no estado (Duarte, 2010; Mestre et al., 2011), sendo sua infecção natural por *L. chagasi* recentemente comprovado (Missawa et al., 2011).

### **1.3. Leishmaniose visceral canina (LVC)**

Diferentemente do que ocorre no ciclo de transmissão da LT, onde se desconhece o potencial do cão doméstico como reservatório, na LV, esse animal possui um papel já bem sedimentado, sendo considerado um importante reservatório doméstico de *L. chagasi* (Dantas-Torres, 2007; Dantas-Torres et al., 2012). No contexto epidemiológico da urbanização da LV, o cão possui grande importância na manutenção e dispersão da doença, sendo um dos principais alvos nas ações de controle (MS, 2006). No Brasil, apesar do primeiro caso canino ter sido descrito em 1938 (Chagas et al., 1938), foi a partir dos relatos de Deane e Deane, em 1955, que constataram a presença de formas amastigotas na pele de cães infectados, facilitando a infecção pelos vetores. Portanto, esses autores passaram a incriminar o cão como um dos prováveis elos no ciclo de transmissão no ambiente doméstico. Desde então, a notificação de cães infectados em áreas endêmicas, associado ao aparecimento dos casos humanos, tem sugerido que o cão infectado possa manter e amplificar ciclos instalados no peridomicílio (Alencar e Cunha, 1963; Alencar, 1978; Marzochi et al., 1985a,b; Paranhos-Silva et al., 1998; Marzochi et al., 2009). Dessa forma, os órgãos sanitários competentes passaram a adotar medidas objetivando a interrupção desse ciclo de transmissão, através da detecção e eutanásia dos cães sororeatores (MS, 2006).

Inquéritos sorológicos caninos vêm sendo realizados, em todo o Brasil, não só para o controle da doença, mas também para o conhecimento da dimensão da LV no país e do envolvimento do cão na cadeia epidemiológica (Alves et al., 1998; Moura et al., 1999;

Nunes et al., 2001; Cabrera et al., 2003; Savani et al., 2003; Silva e Rosa, 2005; Monteiro et al., 2005; Almeida et al., 2009). Tais pesquisas demonstraram o surgimento de casos da doença em áreas anteriormente indenes para LV, como a região sul do Brasil, onde cães foram encontrados parasitados por *L. chagasi* em São Borja (RS) e Florianópolis (SC) (Souza et al., 2009a; Figueiredo et al., 2012). Segundo Cowell et al. (2011) os cães são considerados elementos de dispersão de certas zoonoses, pois são animais frequentemente deslocados entre diferentes áreas, podendo carrear agentes etiológicos de importantes doenças. Para Figueiredo et al. (2012) a tentativa de alguns proprietários burlarem a principal metodologia de controle, ou seja, a eutanásia de cães sororeatores, acabam transferindo seus animais para áreas não endêmicas, onde a realização de inquérito sorológico não é praticado, colocando em risco a população dessas áreas.

O quadro clínico da leishmaniose visceral canina (LVC) é bastante variável, apresentando-se desde aparente estado sadio a quadros graves de caquexia associada a outras complicações (Marzochi et al., 1985b; Alvar et al., 2004; Miró et al., 2008; Paradies et al., 2010). De acordo com Saridomichelakis (2009), os parasitos podem ser eliminados localmente na pele, acarretando em infecção autolimitante; podem ser sequestrados na pele e linfonodo, resultando em infecção não disseminada ou usualmente assintomática ou ainda, disseminar-se por todo o corpo, ocasionando casos sintomáticos ou assintomáticos, dependendo da susceptibilidade do animal. Baneth et al. (2008) descrevem que o curso clínico da infecção por *Leishmania* sp. em áreas endêmicas pode estar relacionado a ocorrência e ao número de picadas do vetor, as espécies de *Leishmania* envolvidas; predisposição genética e da resposta imune do animal.

Os sinais clínicos mais comuns nos cães são as alterações cutâneas (alopecia, dermatites, descamações, úlceras cutâneas, onicogribose); sinais oculares (conjuntivite, ceratoconjuntivite, uveíte); linfadenopatia local ou generalizada; anemia, febre e

hepatoesplenomegalia (Marzochi et al., 1985b; Genaro et al., 1988; Silva et al., 2001; Alvar et al., 2004; Reis et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2009). De acordo com a ausência ou presença de um ou vários destes sinais clínicos, os animais podem ser classificados como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Mancianti et al., 1988; Abranches et al., 1991). Em áreas endêmicas a prevalência de cães assintomáticos tem demonstrado ser superior a dos sintomáticos (Dantas-Torres et al., 2006; Almeida et al., 2009). Segundo Paradies et al. (2010) tal característica pode estar associado a possível resistência canina, tendo em vista a não progressão clínica observada em alguns cães de seu estudo. Entretanto, epidemiologicamente, é importante ressaltar que em todas essas fases o animal apresenta intenso parasitismo cutâneo, servindo de fonte de infecção para os insetos vetores (Travi et al., 2001). A ampla diversidade de sinais clínicos apresentados por estes animais e a grande porcentagem de cães assintomáticos torna o diagnóstico clínico da doença um grande desafio em áreas endêmicas (Ikeda-Garcia e Feitosa, 2006). Na LVC, a distribuição do parasito pode ser extensiva, alcançando órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele, medula óssea, dentre outros (Alvar et al., 2004; Reis et al., 2009; Saridomichelakis, 2009), diferente do que ocorre no homem onde o parasito é normalmente limitado à medula óssea, baço e fígado (Swenson et al., 1988).

A eutanásia de cães sororeatores é uma das recomendações de controle para LV no Brasil (MS, 2006). No entanto, tal medida tem gerado discussões por não conter o avanço da doença, gerando questionamentos quanto ao papel desses animais no ciclo de transmissão (Costa, 2011; Dantas-Torres et al., 2012). Estratégias alternativas no controle têm sido propostas, desde diferentes protocolos terapêuticos para o cão (Tassi et al., 1994; Slappendel e Teske, 1997; Rougier et al., 2012), uso de coleiras impregnadas com inseticida (Killick-Kendrich et al., 1997) ao desenvolvimento de vacinas (Da Silva et al., 2000; Borja-Cabrera et al., 2002). Entretanto, tais alternativas, devem ser tratadas com cautela, pois devem



considerar diferentes aspectos, desde custos, praticidade de aplicação em larga escala e eficácia. Mesmo não aceito pela população, permanece a prática da eutanásia de cães sororeatores, como uma das medidas de controle da LV.

#### **1.4. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Na LVC, a presença do parasito nos mais diferentes tecidos e órgãos provocam reações características da doença, entre as quais a ativação policlonal de linfócitos B, produzindo elevados níveis séricos de imunoglobulinas. Se por um lado esses altos níveis de anticorpos não possuem significado de proteção, por outro, facilita o diagnóstico laboratorial através de testes sorológicos (MS, 2006). Por muitos anos a imunofluorescência indireta (IFI) foi o método recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico confirmatório da infecção canina, considerando positivos cães com títulos de anticorpos  $\geq 1:40$  (MS, 2006). Além da IFI, diversas outras técnicas sorológicas têm sido comumente usadas no diagnóstico da LVC, como ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação direta e testes imunocromatográficos (Alvar et al., 2004). Os testes imunocromatográficos cada vez mais têm sido utilizados por possuírem operação local, apresentando alta sensibilidade e especificidade, serem de fácil uso e não requererem estrutura laboratorial (Reithinger e Dujardin, 2007; Srivastava et al., 2011). Antígenos recombinantes de *L. chagasi* (rK9, rK26 e rK39) têm sido utilizados em ensaios imunoenzimáticos apresentando alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LV humana e canina (Lima et al., 2010; Mohapatra et al., 2010). Recentemente, o teste imunocromatográfico Dual path plataforma (DPP) foi introduzido na rotina diagnóstica durante os inquéritos caninos, atuando como um teste de triagem (MS, 2011). Grimaldi Jr et al. (2012) ao analisar tal teste observaram alta especificidade (96%) e alta sensibilidade (98%) em cães sintomáticos. Entretanto nos casos assintomáticos o teste demonstrou baixa sensibilidade (47%). Segundo Reis et al. (2006),

altos títulos de anticorpos está associada com elevado parasitismo e doença. Embora na presença de baixos níveis de anticorpos é importante acompanhamento com outras técnicas para confirmar a infecção (Miró et al., 2008). Um dos pontos considerados crítico na utilização de técnicas sorológicas é a possibilidade de reações cruzadas com outros agentes tripanosomatídeos (Vexenat et al., 1996; Luciano et al., 2009; Silva et al., 2011; Alves et al., 2012), principalmente em áreas de sobreposição.

Apesar de frequentemente o diagnóstico de LVC se basear em análises sorológicas, a confirmação da infecção a partir da demonstração do parasito é importante. Isto pode ser feito em material biológico como aspirado de linfonodo, baço, fígado e medula óssea (Marzochi et al., 1985b; Genaro et al., 1988; Maia et al., 2009), empregando métodos parasitológicos clássicos (citologia e isolamento em meio de cultura) (Souza et al., 2009a; Srivastava et al., 2011). Outras metodologias como a análise histopatológica e imuno-histoquímica (IHQ), também tem sido utilizadas como uma alternativa para o diagnóstico (Moreira et al., 2007; Calabrese et al., 2010; Figueiredo et al., 2010).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método sensível e específico na detecção de DNA de *Leishmania* sp. em uma variedade de amostras clínicas, sendo mais sensível que os métodos sorológicos e parasitológicos convencionais (Maia et al., 2009; Pandey et al., 2010; Coura-Vital et al., 2011). Além disso, possibilita a diferenciação das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção através da utilização de oligonucleotídeos específicos ou por enzimas de restrição (Andrade et al., 2006; Gomes et al., 2008; Quaresma et al., 2009). A PCR quantitativa, além de apresentar maior sensibilidade em comparação à PCR qualitativa, possibilita diagnóstico mais acurado, evolução clínica do animal, e avaliação da efetividade terapêutica (Francino et al., 2006; Tupperwar et al., 2008; Maia et al., 2010). Apesar de mais sensível, a PCR não costuma ser

utilizada na rotina diagnóstica de cães, sendo indicada em situações especiais como uma ferramenta útil na confirmação de casos duvidosos.

Em virtude da dificuldade encontrada no diagnóstico da LVC, principalmente nos cães assintomáticos, a utilização de diferentes amostras biológicas, bem como de técnicas com princípios distintos é de suma importância na correta identificação da infecção (Paradies et al., 2010; Dantas-Torres et al., 2012).

### **1.5. Fatores de risco associados as Leishmanioses**

Na epidemiologia da LV humana, estão relacionados fatores individuais, como a idade, *status* nutricional e fatores ambientais. Idade inferior a cinco anos foi considerado fator de propensão a doença (Evans et al., 1992), com risco em torno de 11,4 vezes maior quando comparado a população adulta (Thompson et al., 2002). Entretanto, alguns estudos não descrevem associação significativa para esta variável (Ranjan et al., 2005). A proximidade das residências a vegetação e presença de outros animais no peridomicílio também tem sido um fator associado à doença humana e canina (Evans et al., 1992; Thompson et al., 2002; Borges et al., 2009). Residências com cobertura de palha, paredes de barro e sem piso apresentaram fatores de risco em alguns estudos (Ranjan et al., 2005), assim como o acúmulo de lixo nas proximidades da residência (Yadon et al., 2003). A presença do cão no domicílio, não determinou risco significativo para aquisição da doença (Evans et al., 1992). Entretanto, alguns estudos relatam que o risco do homem contrair a LV aumenta na presença de cães infectados ou não no peridomicílio (Gavvani et al., 2002; Borges et al., 2009; Faye et al., 2011).

Pela importância dos cães na epidemiologia da LV, inúmeros estudos têm sido feitos na tentativa de conhecer os fatores que possam ter relevância nesse contexto. Aspectos como sexo, idade, raça, tipo de pelagem, função dos animais, entre outros, têm sido investigados.

Aspectos relacionados ao hábito do animal como função de guarda, habitar o peridomicílio foram descritos como fatores de risco para LVC, devido ao maior contato com o vetor. Cães de grande porte, pela maior área corporal, também foi um aspecto mencionado (Amora et al., 2006). Estudos demonstram não haver predisposição quanto ao sexo e faixa etária (Almeida et al., 2009; Oliveira et al., 2010). Raças, como Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler têm sido relatadas como mais susceptíveis para desenvolver a doença (França-Silva et al., 2003), enquanto a raça Ibizan Hound raramente desenvolve sinais clínicos de LVC (Solano-Gallego et al., 2000). Outros estudos não confirmaram predisposição racial para LVC (Almeida et al., 2009; Oliveira et al., 2010). Associado a isso, a proximidade das residências caninas com áreas de vegetação têm sido associado à infecção, justificado pelo maior contato ao vetor nesses ambientes (Rondon et al., 2008).

Um dos fatores de risco observados mundialmente está associado ao processo migratório, vinculado à deterioração das condições sociais e econômicas. A expansão da doença no nordeste brasileiro coincidiu com a migração de pessoas e animais para a zona urbana em consequência da seca. Em outras regiões do Brasil, fenômenos como construção de rodovias, exploração mineral e agropecuária ou atividades militares tiveram grande associação (Antoniali et al., 2007). Estes dados demonstram que o controle da doença deve focar inúmeros aspectos na cadeia epidemiológica.

### **1.6. Tripanosomatídeos de ocorrência em cães domésticos**

O gênero *Trypanosoma* contém agentes causadores de inúmeras doenças de importância médica e veterinária, sendo foco de atenção nas ações de Saúde Pública (Eloy e Lucheis, 2009). Nesse contexto, o cão doméstico tem sido alvo de alguns estudos.

Na epidemiologia da doença de Chagas os mamíferos domésticos (cães e gatos) e os peridomésticos (roedores e marsupiais) são responsáveis pela interação entre os ciclos

doméstico e silvestre de transmissão (Cardinal et al., 2008). Cães infectados reproduzem com fidelidade as fases aguda e crônica da doença que ocorre no homem (Andrade et al., 1997), sendo considerado um bom modelo experimental desta Tripanossomíase. Acredita-se que estes animais infectam-se do mesmo modo que o homem, através do contato direto com fezes e urina de triatomíneos, sendo também uma vítima no ciclo de transmissão.

Segundo Estrada-Franco et al. (2006) cães domésticos representam fator de risco para doença de Chagas para o homem, associado ao estreito contato entre os mesmos, particularmente quando os cães são mantidos dentro da residência aumentando significativamente a transmissão. Devido a sua persistente parasitemia, esses animais têm uma maior capacidade de infectar os triatomíneos do que o homem e tem sido usado como eficiente sentinela para avaliar a reinfeção por *T. cruzi* na vigilância do vetor e infecção humana (Crisante et al., 2006). A importância canina na epidemiologia da doença de Chagas tem impulsionado estudos de soroprevalência nas áreas endêmicas (Campos-Valdez et al., 2001; Souza et al., 2009).

Outra espécie, que no Brasil, aflige os proprietários de cães, é o *T. evansi* cuja presença de infecção canina é tida em algumas situações, como uma fonte de propagação deste protozoário (Franke et al, 1994; Savani et al., 2005; Franciscato et al., 2007). *T. evansi* é o agente da doença conhecida como “Mal das cadeiras” que causa considerável mortalidade entre equinos na região Centro-oeste do Brasil, resultando em significativa perda econômica. Alta morbidade e mortalidade são observadas em cães infectados com *T. evansi*. Franke et al. (1994) em estudo no pantanal matogrossense observou uma prevalência de 30% de cães infectados por *T. evansi*, sugerindo que seu contato com equinos pode fazer desses animais importantes reservatórios para o parasito na região. A transmissão deste agente é feito de modo mecânico por intermédio de dípteros hematófagos dos gêneros *Stomoxys* e *Tabanus*.

Nas Américas, outra espécie de tripanosoma frequentemente encontrado infectando homens, animais domésticos e silvestres é *T. 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 ao *T. cruzi*, dificultando o diagnóstico diferencial na infecção (Ramirez et al., 2002). A infecção em cães por *T. rangeli* já foi descrita em mais de uma ocasião (Pifano et al., 1948; D' Alessandro, 1976; Dantas-Torres, 2008).

Recentemente, no município do Rio de Janeiro, foi descrita uma nova espécie do gênero *Trypanosoma*, identificado como *Trypanosoma caninum* (Madeira et al., 2009a), infectando um cão doméstico. Posteriormente a este relato, outras amostras desse parasito foram encontrados em outras áreas do município do Rio de Janeiro (Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011) e em outras regiões como Belo Horizonte, Bauru e Brasília (Barros et al., 2012). Em todas as ocasiões, esse parasito foi isolado em cultivo axênico durante estudo envolvendo as leishmanioses caninas.

Apesar de atualmente já se ter o relato de 53 amostras de *T. caninum* (Barros et al., 2012), pouco se sabe sobre a biologia e epidemiologia desse parasito, embora algumas informações já possam ser consideradas: a) *T. caninum* é facilmente isolado em meio de cultura axênica apresentando todas as formas evolutivas características do gênero *Trypanosoma* (Hoare, 1972). No cultivo em meio de cultura bifásico (NNN + meio Schneider) formas epimastigotas são predominantes, mas formas tripomastigotas, esfèromastigotas e formas em fases de transição são também observadas. A manutenção desse parasito em meio de cultura foi um passo inicial e constitui condição crucial para o seu estudo (Madeira et al., 2009a); b) *T. caninum* não é capaz de infectar experimentalmente triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Esse dado sugere que talvez outros artrópodes possam estar atuando como vetores, como é observado no ciclo de outras

espécies de tripanosomas, sendo importante que possíveis vetores, como mosquitos, flebotomíneos, carrapatos e pulgas sejam investigados (Madeira et al., 2009a). Em áreas endêmicas de LV, já houve a suspeita da participação de carrapatos no ciclo de transmissão de *L. chagasi* entre cães domésticos (Coutinho et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2012) e c) outro aspecto importante está relacionado à morfologia desse parasito. *T. caninum* pode ser facilmente distinguido de outros tripanosomas que ocorrem em mamíferos, pelo tamanho do comprimento total do corpo e do cinetoplasto de formas tripomastigotas, embora a heterogeneidade morfológica descrita para os representantes do gênero *Trypanosoma* restrinja este parâmetro para classificação ou identificação (Madeira et al., 2009a).

Inúmeros aspectos biológicos ainda precisam ser conhecidos sobre essa nova espécie. Entretanto, um aspecto interessante é o sítio anatômico de onde tem sido isolado, apresentando uma característica incomum e inédita para os representantes do gênero *Trypanosoma*, relatado em vários estudos. Até o momento, todos os isolados foram obtidos a partir do cultivo da pele íntegra de cães aparentemente saudáveis. Outro dado importante, refere-se a patogenicidade desse parasito para os cães. Aparentemente, *T. caninum* parece não ser patogênico para o cão, tendo sido isolado, na maioria das vezes, de cães saudáveis (Madeira et al., 2009a). No entanto, apesar dessa característica, esse parasito pode estimular o sistema imune humoral do cão, induzindo a produção de anticorpos que podem reagir especificamente e de forma cruzada com outros tripanosomatídeos, principalmente com *Leishmania*, para o qual os cães domésticos são rotineiramente monitorados (Alves et al., 2012).

Dessa forma, a presença de *T. caninum* em diferentes regiões brasileiras sugere a existência de um ciclo natural desse protozoário entre cães domésticos. Esse fato é de grande importância já que *T. caninum* tem sido encontrado em áreas endêmicas de LV.

Ainda não se conhece os possíveis vetores, assim como são escassas as informações epidemiológicas desse parasito. Considerando a importância desse conhecimento, estudos devem ser incentivados, visando esclarecer aspectos relacionados ao ciclo epidemiológico, diagnóstico e à prevalência. Embora *T. caninum* pareça não causar qualquer alteração clínica ou dermatológica nos cães infectados, a compreensão de como este parasito está sendo mantido e transmitido sob condições naturais é fundamental, principalmente em áreas onde as leishmanioses caninas ocorrem.



## 2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, no estado de Mato Grosso, vem-se registrando um aumento do número de casos humanos de leishmaniose, tanto da forma tegumentar quanto visceral da doença. O estado atualmente está classificado em terceiro lugar em número de notificações da forma tegumentar no Brasil e, recentemente, surtos da forma visceral foram diagnosticados em várias cidades do estado, inclusive com casos de óbitos (MS, 2012a; MS, 2012b).

Sabendo-se da importância dos cães domésticos na cadeia de transmissão da LV e da carência de informações sobre a doença canina em diferentes municípios desse estado, torna-se importante pesquisar a distribuição e prevalência da infecção canina na cidade de Cuiabá, município considerado prioritário pela Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso, no que concerne à doença. Deve-se considerar que as leishmanioses estão em expansão em diversas regiões brasileiras e, assim, esforços devem ser empregados para conter a sua propagação (MS, 2006; Marzochi et al., 2009). Neste contexto, o diagnóstico acurado é uma questão a ser solucionada, contribuindo para a identificação inequívoca dos casos de infecção por *L. chagasi* em tempo hábil.

Ainda nesse contexto, a descrição de outros tripanosomatídeos em áreas de sobreposição com a LV, como *L. braziliensis*, *Trypanosoma caninum*, espécie recentemente descrita, e *T. cruzi* pode ter implicações para o controle desta doença na medida em que as ações de controle incluem a eutanásia de cães soropositivos (Silva et al., 2011). Adicionalmente, identificação das espécies de *Leishmania* circulantes em cães domésticos, assim como o estabelecimento de possíveis fatores de risco é de fundamental importância (Souza et al., 2009a). Todo o conhecimento gerado é essencial para o estabelecimento de medidas de controle apropriadas, bem como, importantes para nortear estudos epidemiológicos que possam contribuir para o controle da doença. Neste sentido, a

contribuição deste trabalho se faz pelo conhecimento de aspectos que envolvem não só a leishmaniose canina em Cuiabá, mas também na identificação de mais um agente complicador do diagnóstico sorológico da infecção por *L. chagasi* em cães.

Este estudo foi desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Leishmanioses do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), o Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) e o Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish), ambos do IPEC/FIOCRUZ, que contam com equipe experiente no estudo dessa enfermidade promovendo intercâmbio válido no que concerne ao desenvolvimento da pesquisa no estado de Mato Grosso.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a ocorrência da infecção por *L. chagasi* e outros tripanosomatídeos em cães domésticos no município de Cuiabá, Mato Grosso.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Avaliar a cultura como ferramenta diagnóstica da leishmaniose visceral canina e outros tripanosomatídeos, investigando diferentes espécimes clínicos;
2. Caracterizar as amostras de *Leishmania* ou outros tripanosomatídeos isolados em meio de cultura, empregando a técnica de eletroforese de enzimas e PCR;
3. Estimar a soroprevalência através da imunofluorescência indireta e identificar os fatores de risco associados com a infecção canina por *Leishmania*;
4. Avaliar a PCR como ferramenta diagnóstica da leishmaniose visceral canina, investigando diferentes amostras biológicas dos cães incluídos no estudo;
5. Descrever aspectos clínicos de cães infectados por *Leishmania chagasi* e outros tripanosomatídeos correlacionando com dados laboratoriais;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Desenho do estudo e população alvo**

Este estudo consistiu na investigação diagnóstica de cães domiciliados na cidade de Cuiabá, através da realização de inquérito canino, por visitas domiciliares, considerando o último domicílio a cada cinco contados. A amostragem canina foi definida pelo programa Epi info 3.3.2 (CDC, Atlanta, EUA) e considerou cães de ambos os sexos e idade igual ou superior a seis meses, provenientes de áreas onde casos humanos e caninos de LV foram relatados. O tamanho amostral foi de 430 animais e foi calculado considerando a soroprevalência para LVC de 8,4%, obtida em estudo realizado em Cuiabá (Mestre e Fontes, 2007), com intervalo de confiança de 99% e erro aceitável de 2%, com população baseada no censo canino realizado no ano de 2007. Em algumas etapas do estudo, foram incluídos cães atendidos na rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET).

### **4.2. Área de Estudo**

O município de Cuiabá está localizado pelas coordenadas 15°35'56.10''S e 56°05'41.62'' e possui extensão territorial de 3.538 km<sup>2</sup> com altitude de 165 metros acima do nível do mar, com vegetação predominante constituída de cerrado. Apresenta clima tropical quente e sub-úmido com precipitação média anual de 1750 mm, cuja temperatura máxima, nos meses mais quentes, fica em torno de 43°C e a mínima varia entre 12 e 14°C. Possui uma população de 526.830 habitantes (IBGE, 2009). O inquérito canino foi realizado nos bairros Barreiro Branco (68 cães de 150) e Coxipó do Ouro (53 cães de 92), localizados em área rural e regional Norte e nos bairros Osmar Cabral (107 cães de 770), Bela Vista (110 cães de 939) e Jardim União (92 cães de 344), na urbana e regionais, Sul, Leste e

Norte, respectivamente, na cidade de Cuiabá (Fig. 1). Os casos atendidos no HOVET foram oriundos de Cuiabá e de municípios vizinhos, sendo incluídos no estudo 52 cães.



**Figura 1: Localização espacial dos bairros pesquisados para a ocorrência de leishmaniose visceral canina na cidade de Cuiabá, Mato Grosso.**

#### **4.3. Animais e coleta de amostras**

Após autorização dos proprietários, os cães foram contidos mecanicamente amordaçados para exame físico e coleta de amostras biológicas. O exame físico considerou sinais clínicos relacionados a LVC, de forma que os animais pudessem ser agrupados como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, segundo a classificação proposta por Mancianti et al. (1988), sendo todas as informações registradas em uma ficha (Anexo 2). Todos os animais foram avaliados num único momento, e durante o estudo os animais encontrados naturalmente infectados por *Trypanosoma caninum* foram reavaliados em intervalos de 3, 6 e 12 meses. Para a coleta de amostras biológicas, animais foram sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado a acepromazina (0,2 mg/kg) por via

intramuscular. De todos os animais, incluindo os atendidos no HOVET, foram coletadas as seguintes amostras biológicas:

a) **Sangue:** coletou-se cerca de 10mL de sangue por punção cefálica ou jugular, que foi distribuído para dois tubos, um contendo anticoagulante para cultura e testes moleculares e outro, sem anticoagulante para testes sorológicos. Esse material foi transportado sob refrigeração e, por centrifugação o soro foi separado e conservado a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos. Para cultura, cerca de 0.2-0.4mL foi semeado e o restante do material foi centrifugado a 10.000 rpm para separação da camada leucocitária, utilizada nos testes moleculares.

b) **Biopsias teciduais:** foram coletados fragmentos de pele íntegra da região escapular e úlceras cutâneas quando presentes. Para isso, foi realizada tricotomia, anti-sepsia e anestesia local com lidocaína a 2%. Após, foram coletados três fragmentos de pele íntegra utilizando *punch* de 3mm que posteriormente foram processados para exames parasitológicos (cultura) e moleculares. Das lesões, foram coletados três fragmentos para os mesmos exames.

c) **Punções:** em todos os animais foi realizado o aspirado ganglionar, obtido dos linfonodos poplíteos, utilizando seringa de 20ml com agulha 30x8mm, com o auxílio do citoaspirador de Valeri. Realizou-se também, aspirado de medula óssea (MO), obtido do manúbrio do esterno, utilizando seringa de 20ml com agulha 40x12mm, após tricotomia, assepsia e anestesia local com lidocaína 2%. A MO foi processada para cultura e para ensaios moleculares e o material puncionado do linfonodo foi reservado somente para testes moleculares.

#### **4.4. Ensaio empregados no estudo**

##### **4.4.1. Testes sorológicos**

Todos os animais foram avaliados quanto à reatividade sorológica para antígenos de *Leishmania* sp. através dos ensaios de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando o kit (IFI-leishmaniose visceral canina) produzido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ/MS). Os animais que foram encontrados infectados por *Trypanosoma caninum*, além da IFI, foram avaliados pelos testes ELISA (EIE-leishmaniose visceral canina) e pelo teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (Dual Path Platform - DPP<sup>TM</sup>). Esses animais, também foram avaliados pelos testes de IFI e ELISA, empregando antígenos homólogos para o diagnóstico de *T. caninum* (Alves et al., 2012).

##### **4.4.2. Isolamento parasitário em meio de cultura**

Foram processados para cultura, sangue, MO e fragmentos teciduais (pele e úlceras). Os fragmentos de pele e úlceras, logo após a biopsia, foram mergulhados em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina) e conservados a temperatura de 4°C por 24 horas. Após, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicole) contendo como fase líquida o meio Schneider's (*Drosophila medium* - Sigma), acrescido de 10% de soro fetal bovino. O sangue periférico e MO, coletados em tubos contendo anticoagulante, foram semeados diretamente no meio de cultura (cerca de 0.2-0.4mL). As culturas foram feitas em duplicatas e conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 40-50 dias por exames a fresco buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu isolamento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária para posterior caracterização etiológica.

#### **4.4.3. Exame citológico**

Para este exame, foram processadas amostras de sangue, MO e aspirado de linfonodo, coletados do grupo de animais infectados por *T. caninum*. As lâminas foram confeccionadas no momento da coleta e posteriormente submetidas à fixação com álcool metílico P.A. durante cinco minutos e coloração pelo Giemsa. Após, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico para pesquisa de formas parasitárias, percorrendo, no mínimo cerca de 200 campos utilizando objetiva de imersão (x 1000).

#### **4.4.4. Testes moleculares**

Utilizou-se diferentes ensaios pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que variou de acordo com o objetivo do estudo. Foram processadas amostras de sangue (capa leucocitária), pele íntegra, úlceras cutâneas, MO e aspirado de linfonodo.

A extração de DNA das diferentes amostras clínicas foi realizada pelo método fenol/clorofórmio de acordo com protocolo descritos por Gomes et al. (2007). Sucintamente, as amostras foram colocadas em tampão de lise contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% *N*-laurilsarcozyl e 100 µg/ml de proteinase K e submetidos à agitação em *vortex* e posteriormente incubados a 56°C até completa lise celular. Os aspirados MO, linfonodo e capa leucocitária permaneceram nessa condição por cerca de 30-120 minutos e os fragmentos de tecido (pele e úlcera), por cerca de 5-24 horas. Após, realizou-se lavagem com etanol 70% por 10 minutos a 10,000 x g e o precipitado de DNA foi dissolvido em água ultra pura contendo 20µg/ml de RNAase e estocado a -20°C até a realização da PCR.

Para as amostras isoladas em cultura, utilizou-se o processo de extração com DNAsol (Barros et al, 2012).



Para os ensaios de PCR, utilizaram-se os iniciadores descritos abaixo, considerando os protocolos descritos nas respectivas referências.

**Tabela 1: Especificação dos alvos moleculares que foram utilizados neste estudo**

Alvo do DNA	Iniciadores	Sequência do alvo 5' - 3'	Referência
18S rDNA	TRY927F	GAAACAAGAAACACGGGAG	Smith et al. (2008)
	TRY927R	CTACTGGGCAGCTTGA	
	SSU561F	TGGGATAACAAAGGAGCA	
	SSU561R	CTGAGACTGTAACCTCAAAGC	
kDNA	150	(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACC AACCCC	Degrave et al. (1994)
	152	GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA	
β-globina		CAACTTCATCCACGTTCCACC ACACAACCTGTGTTCACTAGC	Quaresma et al. (2009)
kDNA	RV1 RV2	CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA	Lachaud et al. (2002)

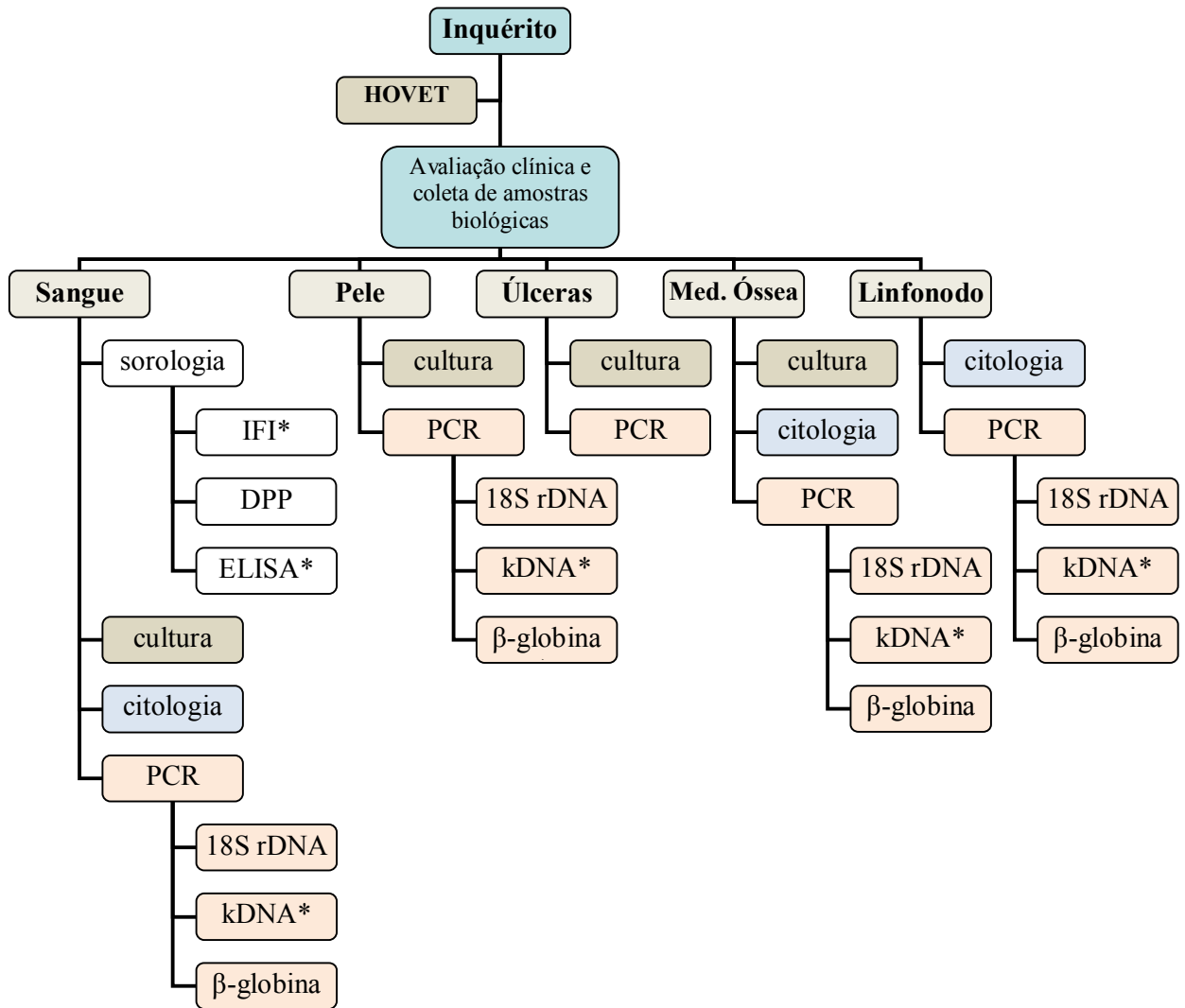
#### 4.4.5. Sequenciamento molecular

O sequenciamento molecular foi realizado com os produtos amplificados para os alvos do gene ribossomal (18S rDNA) das amostras de *T. caninum* isoladas no estudo. Após a amplificação, os produtos do segundo “round” foram purificados com kit Quiackiq (Qiagen) seguindo orientações do fabricante. As sequências de nucleotídeos foram então determinadas em sequenciador automático (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) e analisadas com o programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank e alinhadas entre si e com sequências de diferentes espécies de tripanosomatídeos recuperada no GenBank.

#### 4.4.6. Eletroforese de enzimas (MLEE)

Todos os isolados obtidos em meio de cultura (formas promastigotas) foram identificados por eletroforese de enzimas (isoenzimas). Inicialmente foi feita a expansão parasitária para obtenção de cerca de  $10^9$  parasitos que posteriormente foi submetida a lavagens em tampão próprio, sob centrifugação até a obtenção de um sedimento que foi colocado em nitrogênio líquido ( $N_2$ ) até a realização das corridas eletroforéticas. Foram empregados cinco sistemas enzimáticos: 6PGDH; GPI; NH (dois loci) e G6PDH baseados nos protocolos de Cupolillo et al. (1994). Amostras de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram empregadas em todas as corridas eletroforéticas. Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose 1% (Tipo V) em tampão de acordo com o sistema enzimático utilizado, que depois de dissolvida e fundida foi colocada sobre um filme de poliestireno onde a amostra teste foi aplicada. A corrida eletroforética foi feita empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal devidamente acoplada a um banho maria com circulação para manter a refrigeração em torno de 4°C. A revelação da atividade enzimática das amostras 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, baseados em protocolos já descritos na literatura. A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% e a mobilidade eletroforética dos isolados foi comparada com o padrão das amostras de referência.

Na figura 2 apresentamos um esquema, resumindo as etapas que envolveram a captação dos animais estudados, as diferentes amostras biológicas analisadas, assim como os métodos laboratoriais empregados para o diagnóstico e identificação dos parasitas isolados.



\* refere-se a dois ensaios realizados

**Figura 2.** Fluxograma apresentando as etapas do estudo, identificando as amostras biológicas coletadas dos animais e os ensaios laboratoriais empregados nas análises.

#### 4.5. Análise epidemiológica e variáveis estudadas

Para descrever as características gerais da população canina e do ambiente de moradia, foram coletadas informações, junto ao proprietário do animal, que foram incluídas na ficha individual, preenchida no momento da visita (Anexo 2). Tais informações foram utilizadas para análise dos fatores de risco associados à infecção canina para leishmaniose, utilizando dados sorológicos (IFI).

Com relação ao ambiente, foram consideradas as seguintes variáveis: proximidade com áreas de vegetação (< 100m ou > 100m); presença de outros animais domésticos (sim, não); presença de árvores e criações de animais no quintal (sim, não); coleta pública de lixo (sim, não). Com relação aos animais, consideramos para as análises: raça (com raça definida – CRD e sem raça definida – SRD); sexo (macho ou fêmea); idade (< 1 ano, 1-3 anos, 3-6 anos, >6 anos ou indeterminada); função do animal na casa (função de guarda, caça ou companhia); habitat do animal (limitado ao domicílio, ao peridomicílio ou possuir livre acesso a rua). Consideramos ainda, o conhecimento dos proprietários com relação à doença e às medidas de controle e, a ocorrência de casos caninos e humanos da doença no entorno das áreas estudadas.

#### **4.6. Análise dos resultados**

Todos os dados clínicos e demográficos dos animais, aspectos do ambiente e resultados obtidos com as diferentes amostras biológicas e testes laboratoriais, foram transferidos para um banco de dados e analisados de acordo com o objeto das publicações. Utilizou-se o programa estatístico EpiInfo 3.3.2 (CDC, Atlanta, EUA).

Para análise dos fatores de risco, associados à infecção por *Leishmania*, inicialmente consideramos a frequência dos eventos selecionados e posteriormente, foram realizados cruzamentos das variáveis independentes com a dependente (sorologia), determinando-se a “odds ratio”, com intervalo de confiança de 95%. A significância estatística das associações foi calculada através do teste qui-quadrado ou exato de Fisher’s.

Com relação aos dados laboratoriais, foi calculada a frequência dos resultados positivos, considerando a amostra biológica analisada. Para comparações dos resultados da PCR (específica para *Leishmania*) e o *status* clínico dos animais foi utilizado teste do qui-quadrado. Avaliamos, também, a concordância entre a PCR e o resultado da cultura, através do Kappa (k), empregando a classificação proposta por Shrout (1998).

#### **4.7. Procedimento Ético**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), sob o nº 52/2009-3, licença LW-01/10 (Anexo 1). No momento da visita domiciliar, foi solicitada ao proprietário a assinatura de um termo de consentimento para a realização dos procedimentos nos animais.

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados no formato de artigos publicados ou em fase de publicação.

Nesta seção estão anexados seis artigos ordenados da seguinte forma:

- **Artigo 1:** Apresenta e discute a cultura parasitológica como ferramenta diagnóstica da leishmaniose visceral canina, realizada em diferentes amostras clínicas de 482 cães.
- **Artigo 2:** Apresenta a caracterização dos casos de *Trypanosoma caninum* descritos em diferentes regiões do Brasil, incluindo os casos detectados em Cuiabá.
- **Artigo 3:** Refere-se ao estudo dos fatores de risco associados com a infecção canina por *Leishmania* nas áreas estudadas.
- **Artigo 4:** Apresenta e discute a utilização da PCR como uma ferramenta de rastreamento de *Leishmania chagasi*, empregando diferentes amostras biológicas coletadas dos cães estudados.
- **Artigo 5:** Descreve aspectos clínicos e laboratoriais de 14 casos da infecção por *Trypanosoma caninum* detectados durante a realização deste estudo.
- **Artigo 6:** Relato de caso, visando descrever o encontro, pela primeira vez, da infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* em um cão na cidade de Cuiabá

## 5.1 - Artigo 1

---

### Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs

Publicado na revista Vector Borne Zoonotic Disease, 11: 1555-60, 2011

---

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença em expansão no Brasil, mesmo assim, lacunas relacionadas ao conhecimento das espécies circulantes nas áreas endêmicas ainda persistem. No estado de Mato Grosso, região onde o estudo foi realizado, LV tem sido relatada em cerca de 34 municípios, no entanto, pouco se sabe sobre aspectos da infecção canina e das espécies de *Leishmania* que circulam nesses animais na cidade de Cuiabá. Este estudo objetivou o emprego da cultura parasitológica como ferramenta diagnóstica e rastreamento das espécies de *Leishmania* e de outros tripanosomatídeos na população canina oriundos de regiões onde ocorrem casos de LV. Quatrocentos e oitenta e dois cães foram incluídos no estudo, dos quais, a partir do cultivo de diferentes amostras clínicas, obteve-se isolamento parasitário de 54 animais. *Leishmania chagasi* foi isolada de 40 cães e *Trypanosoma caninum* de 14. Os resultados obtidos neste estudo enfatizam o valor da cultura para o diagnóstico da leishmaniose canina e comprovam a circulação de *L. chagasi*, assim como de *T. caninum*, em diferentes bairros da cidade de Cuiabá, sendo os primeiros relatos da ocorrência de ambos os agentes.

Este artigo responde o objetivo específico nº 1 e parcialmente aos objetivos específicos nº 2 e nº 5 desta tese.















## 5.2 - Artigo 2

---

### **Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?**

Publicado na revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 106: 419-23, 2012

---

*Trypanosoma caninum* é um parasito do gênero *Trypanosoma* recentemente descrito infectando cães. Inicialmente, esse parasito foi descrito no município do Rio de Janeiro e posteriormente em outras regiões do Brasil, levantando a suspeita de um ciclo natural desse protozoário entre cães domésticos. Aspectos biológicos desse parasito, assim como dados epidemiológicos ainda são escassos. A descrição de um novo tripanosomatídeo em áreas endêmicas de leishmaniose visceral pode abrir discussões, relacionadas principalmente ao diagnóstico e eutanásia de cães, baseado somente em evidências sorológicas. A reatividade sorológica cruzada entre membros da família Trypanosomatidae é um fato que constitui um dos maiores problemas em áreas onde ocorre a sobreposição de diferentes agentes etiológicos. Considerando a importância que o cão doméstico possui no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral, é importante que aspectos desse parasita sejam conhecidos. Este artigo trata da identificação taxonômica de 33 amostras de *Trypanosoma caninum* isoladas de cães habitando diferentes regiões brasileiras, entre eles 14 casos descritos em Cuiabá, identificados durante o estudo principal. Neste artigo, além da identificação parasitária, discute-se sobre a possibilidade desse fenômeno interferir nas ações de controle da leishmaniose visceral no Brasil.

Este artigo responde ao objetivo nº 2 desta tese













### 5.3 - Artigo 3

---

#### **Canine Visceral Leishmaniasis: Seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil**

Artigo aceito para publicação na revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,  
2012

---

Nas diversas regiões onde leishmaniose visceral ocorre, são observadas possíveis interações entre os diferentes elos da cadeia epidemiológica. Fatores de risco associados a doença humana e/ou canina têm sido pesquisados, visando obter elementos que possam ser empregados no controle desse agravo. Como já dito anteriormente, em Cuiabá, pouco se conhece sobre aspectos da leishmaniose visceral canina. Assim, este artigo visou estimar a soroprevalência da infecção canina e conhecer possíveis fatores de risco a ela associados na cidade de Cuiabá. Quatrocentos e trinta (430) cães foram avaliados através da técnica de imunofluorescência indireta e, variáveis relacionadas aos animais, ambiente e ao conhecimento dos proprietários sobre a LV foram considerados para as análises. Os resultados demonstraram uma soroprevalência de 22,1% no grupo estudado, revelando que os animais residentes em ambiente rural possuem um risco maior de adquirir a infecção. Também foi visto que fatores relacionados aos hábitos dos animais, como livre acesso a rua e função de guarda foram indicativos preditores da infecção por *Leishmania*. Cuiabá é uma região que possui características propícias à instalação da leishmaniose visceral de forma endêmica e, este estudo contribuiu para o conhecimento de aspectos da doença e aponta a necessidade da inclusão de ações educacionais na rotina de controle nessa cidade.

Este artigo responde ao objetivo específico nº 3 desta tese.







































## 5.4 - Artigo 4

---

### Canine visceral leishmaniasis diagnosis: assessment of PCR in different biological samples

Artigo submetido para publicação na revista Research in Veterinary Science

---

O diagnóstico acurado da LVC ainda é um desafio, já que é uma doença de grande espectro clínico. Embora testes sorológicos sejam os mais aplicados para o diagnóstico, a pesquisa de ferramentas que apresentem maior sensibilidade e especificidade tem sido constantemente buscadas. Nesse contexto, métodos moleculares, como a PCR, têm surgido como uma excelente alternativa, no entanto, não existe um consenso da melhor amostra biológica que possa ser utilizada nesse ensaio. Este artigo divulga o resultado de 430 cães avaliados através da PCR, a partir da utilização de amostras como capa leucocitária, medula óssea, fragmentos de pele e úlceras cutâneas e punção de linfonodo, correlacionando os resultados laboratoriais obtidos com o *status* clínico dos cães. DNA de *Leishmania* sp. foi detectado em 14,6% cães (n=63), independente da amostra analisada, contemplando casos sintomáticos (n=13), oligossintomáticos (n=23) e assintomáticos (n=27). Todas essas amostras foram identificadas como *L. chagasi*, num segundo ensaio de PCR específico para o complexo *L. donovani*. A amostra de linfonodo (41; 9.6%) foi o sítio que apresentou maior frequência de positividade, seguido da pele (27; 6.3%), medula óssea (26; 6.1%) e capa leucocitária (20; 4.6%). Úlceras cutâneas foram positivas em 13 (59,1%) de 22 casos. Adicionalmente, os animais sintomáticos, foram mais facilmente diagnosticados ao utilizarmos amostras de linfonodo, medula óssea e pele em relação ao grupo de cães assintomáticos. Concluindo, a técnica de PCR mostrou-se de grande utilidade na detecção de DNA de *L. chagasi*, especialmente em amostra de linfonodo, independente do *status* clínico do cão. Esse

resultado, associado ao fato de ter sido uma amostra facilmente coletada dos cães, aponta este sítio como uma alternativa para utilização em inquéritos epidemiológicos através da PCR. Úlcera cutânea, quando presente, também representa bom alvo na detecção de LVC.

Este artigo responde o objetivo específico nº 4 desta tese.











































## 5.5. Artigo 5

---

### **Natural infection by *Trypanosoma caninum*, a new parasite isolated from dogs: study of 14 cases occurred on Cuiaba, Brazil**

Artigo submetido para publicação na revista Veterinary Parasitology

---

*Trypanosoma caninum* constitui a mais recente espécie de tripanosomatídeo descrita no Brasil, que tem sido encontrada na infecção natural de cães domésticos. Muito pouco ainda se conhece sobre esse parasito e neste artigo são descritos aspectos clínicos e laboratoriais de 14 cães naturalmente infectados por esse parasito, diagnosticados em Cuiabá durante a realização desta tese. Os animais foram avaliados clinicamente e monitorados em intervalos que variaram de 3 a 12 meses quanto a presença do parasito e/ou DNA em diferentes amostras biológicas através de métodos parasitológicos (cultura e exame direto) e moleculares (PCR). Além disso, anticorpos específicos anti-*T. caninum* e anti-*Leishmania* foram investigados nesses animais. Os resultados revelaram que dos 14 animais estudados, 10 encontravam-se em bom estado geral e tal *status* clínico não variou durante o monitoramento. Anticorpos anti-*T. caninum* foram confirmados em 10 animais e a co-infecção por *L. chagasi* foi comprovada em dois cães. O estudo confirma uma característica biológica particular deste parasito, como já apontado em outros estudos e sugere baixa patogenicidade para os cães. Os resultados apresentados neste artigo comprovam a sobreposição de áreas endêmicas em Cuiabá e contribuem para o conhecimento de aspectos desse novo parasito descrito no Brasil, os quais podem ser úteis em ações de controle que envolve a leishmaniose visceral.

Este artigo responde o objetivo específico nº 5 desta tese.















































## 5.6. Artigo 6

---

### Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in Central Western Brazil – a Case Report

Artigo submetido para publicação na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

---

O gênero *Trypanosoma* contém agentes causadores de inúmeras doenças de importância médica e veterinária, entre eles o *Trypanosoma cruzi*, causando a doença de Chagas, como é conhecida popularmente. Os cães são considerados importantes reservatórios nas áreas endêmicas, representando fator de risco para a população humana. Este relato descreve um caso de doença de Chagas em um cão, ocorrido na cidade de Cuiabá detectado durante a realização desta tese. O animal foi atendido no Hospital Veterinário da UFMT, com histórico de paresia dos membros posteriores com progressão para tetraparesia em cerca de três dias, além de suspeita de gestação. O diagnóstico foi feito a partir de exame citológico em esfregaço sanguíneo, onde formas flageladas tripomastigotas foram encontradas. Adicionalmente, a PCR específica e sequenciamento molecular, confirmou a etiologia do parasito. O animal progrediu para o óbito apesar de ter sido instituído tratamento com diaceturato de diminazeno, que embora não seja utilizada na doença de Chagas, vem sendo empregada na infecção por *T. evansi* com bons resultados. Em Cuiabá, não existe registro da doença de Chagas aguda, sendo este o primeiro relato da doença em cães nessa região, constituindo um alerta aos profissionais da saúde e autoridades sanitárias para a possibilidade da transmissão desta zoonose.

Este artigo está relacionado ao objetivo específico nº 5 desta tese.





























## 6. DISCUSSÃO GERAL

Cães domésticos são considerados importantes reservatórios da *L. chagasi*, agente causador da leishmaniose visceral humana e canina. Por essa razão, são alvos de atenção por parte dos órgãos responsáveis pelo controle (MS, 2006). Na cidade de Cuiabá, estado de Mato Grosso, embora sejam descritos casos humanos de LV, informações precisas sobre a doença nos cães domésticos ainda são escassas. Dessa forma, este estudo se propôs avaliar por diferentes parâmetros, cães domiciliados de cinco bairros em Cuiabá, contribuindo assim, com informações para o conhecimento desse agravo, nas áreas onde casos humanos e caninos são descritos.

A cidade de Cuiabá é classificada como uma área de transmissão moderada para LV (MS, 2006). Até o ano de 2011 foram notificados 22 casos humanos (CCZ, 2012). Apesar de medidas de controle já serem desenvolvidas em algumas áreas dessa cidade, o conhecimento de aspectos epidemiológicos limitam-se aos vetores e à soroprevalência canina (Moura et al., 1999; Almeida et al., 2009; Almeida et al., 2010; Mestre et al., 2011). O conhecimento das espécies de *Leishmania* circulantes na população humana e canina é de suma importância para que estratégias de controle adequadas ao contexto epidemiológico da região sejam desenvolvidas. Até a realização deste estudo ainda não havia sido feito o isolamento e caracterização do agente causador da LV em Cuiabá, e o nosso estudo comprovou, pela primeira vez a circulação de *L. chagasi* nessa região. Dos 430 cães avaliados durante o inquérito por busca ativa, *L. chagasi* foi isolada de 2,8% (n=12) cães. Adicionalmente, dos 52 cães atendidos por demanda espontânea durante atendimento realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), em 28 (53,8%) houve isolamento do agente.

Apesar da cultura parasitológica ser considerada padrão ouro para o diagnóstico das leishmanioses, a tentativa de isolamento parasitário em cães sororeatores não é feito na

rotina investigatória dos casos de LVC, devido ao grande volume de trabalho que é gerado com esta atividade. Entretanto, o isolamento e identificação etiológica são fundamentais, principalmente em áreas consideradas indenes para LV, como foi o caso recentemente descrito no estado do Rio Grande do Sul (Souza et al., 2009a) e Santa Catarina (Figueiredo et al., 2012) para que ações específicas, relacionadas ao controle, sejam implementadas (MS, 2006).

Neste estudo, realizamos o cultivo de diferentes amostras biológicas dos cães e, obtivemos a comprovação da presença de *L. chagasi* em animais das cinco regiões estudadas. A técnica de isoenzimas empregada neste estudo, também se mostrou importante para a identificação etiológica dos isolados de *Leishmania* obtidos dos animais estudados. Adicionalmente, o isolamento de *L. chagasi* em cães oriundos do atendimento clínico do HOVET-UFMT, possibilitou verificar a dispersão do parasito pelo município de Cuiabá e também em municípios vizinhos à capital. Um dado interessante foi constatar que a pele íntegra apresentou-se numericamente superior para o isolamento parasitário em relação aos demais sítios pesquisados, principalmente nos casos sintomáticos. Alguns autores já apontam a pele como importante sítio para detecção de *Leishmania* (Lima et al., 2010; Queiroz et al., 2011). Em estudo conduzido por Madeira et al. (2009), onde 394 cães sororeatores para leishmaniose foram avaliados, *L. chagasi* foi isolada da pele de 78% dos animais estudados. Neste estudo, dos cães com isolamento de *L. chagasi*, 70% tiveram o parasito detectado na pele, reforçando esse sítio como um bom alvo na investigação parasitológica na LVC. Os resultados envolvendo a cultura parasitológica como ferramenta diagnóstica da LVC estão apresentados no artigo nº 1 desta tese.

Outro dado constatado neste estudo está relacionado à condição clínica dos cães estudados. Observamos que os cães assintomáticos estão em maior prevalência como já descrito em outras regiões do Brasil (Dantas-Torres et al., 2006) e que os sinais mais

relevantes encontrados nos cães infectados em Cuiabá estão de acordo com o preconizado na literatura (Alvar et al., 2004; Reis et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2009). Entretanto, tal aspecto não foi importante para o diagnóstico da LVC. Já com relação à idade do cão e a infecção por *Leishmania*, encontramos uma correlação alta e positiva ( $r=1$ ). O longo período de incubação na LVC tem sido associado a predisposição dos cães adultos em desenvolverem a doença (Arias et al., 1996), fato que poderia explicar a alta correlação encontrada neste estudo.

Uma das medidas de controle da LV preconizadas no Brasil inclui a realização de inquérito sorológico canino e posterior eutanásia de cães sororeatores. Tal medida, embora aplicada nas áreas endêmicas, tem sido motivo de questionamentos, principalmente por não conseguir conter o avanço da doença (Costa, 2011). Outra questão que deve ser abordada, nesse contexto, é a possibilidade de ocorrer reações cruzadas nos testes sorológicos devido a presença de outros tripanosomatídeos nas áreas endêmicas (Alves et al., 2012). Em nosso estudo, comprovamos a presença de diferentes agentes tripanosomatídeos, infectando cães domésticos em Cuiabá.

A caracterização das amostras isoladas a partir do diagnóstico parasitológico é de grande importância para diversos estudos, principalmente àqueles que envolvem a vigilância epidemiológica, possibilitando o mapeamento das espécies e/ou variantes de parasitos que circulam em áreas endêmicas. Um dado importante obtido neste estudo foi o isolamento, pela primeira vez na cidade de Cuiabá, de *Trypanosoma caninum*. Essa espécie foi descrita primeiramente no município do Rio de Janeiro (Madeira et al., 2009a) e posteriormente em outras regiões do Brasil (Barros et al., 2012). Em nosso estudo, relatamos a presença desse parasito em 14 cães procedentes de quatro bairros estudados. Esses novos isolados, em associação aos já descritos nas cidades de Brasília, Bauru e Belo Horizonte, demonstram a circulação desse parasito e enfatizam a importância da identificação das espécies que

estejam infectando os cães nas áreas endêmicas para LV. Outro aspecto que deve ser ainda estudado é o impacto que a circulação desse parasito possa causar nos programas de controle da LV. A descrição do encontro de *T. caninum* em Cuiabá está descrito nos artigos nºs 1 e 2 desta tese.

Até o momento, já foram descritos 53 casos da infecção natural por *T. caninum*. No entanto, aspectos relacionados a biologia desse parasito são completamente desconhecidos. Dos 14 casos descritos neste estudo, o diagnóstico da infecção, foi feito a partir do cultivo de pele íntegra, reforçando uma característica biológica dessa espécie. Embora a infecção por *T. caninum* não tenha sido um dos objetivos iniciais deste estudo, o encontro de 14 casos entre os animais estudados, possibilitou a avaliação, mais minuciosa desse grupo de cães e assim contribuir com aspectos relacionados a patogênese e ou virulência desse parasito para os cães, cujos resultados estão apresentados no artigo nº 5 desta tese. Um dado que podemos destacar é a comprovação exclusiva de *T. caninum* em sítio de pele, como já foi mencionado em outros estudos (Madeira et al., 2009a; Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011). O bom estado clínico geral, apresentado por cerca de 70% dos cães infectados por *T. caninum*, no momento do diagnóstico e durante o monitoramento, sugere que o parasito possa não ser patogênico para os cães, sendo a infecção transitória e cursando sem sinais clínicos específicos.

O cão doméstico possui grande importância na manutenção e dispersão da LV e por essa razão, fatores que possam estar associados ao risco do cão adquirir a infecção devem ser bem estabelecidos. Como já dito anteriormente, em Cuiabá, pouco se conhece sobre aspectos da LVC e assim, o nosso estudo visou também, conhecer os índices de soroprevalência canina e estabelecer possíveis fatores de risco que pudessem estar associados à infecção desses animais. Os resultados estão apresentados no artigo nº 3 e demonstraram uma soroprevalência para *Leishmania* sp. que consideramos elevada (22,1%),



frente aos dados obtidos na literatura (Savani et al., 2003; Almeida et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Santos et al., 2010). A elevada prevalência da infecção constatada em cães oriundos dos bairros urbanos confirma a tendência de urbanização da LV em Cuiabá como já revelada em outras regiões do Brasil. Entretanto, é importante ressaltar que os bairros rurais também detêm altas taxas da infecção canina, representando um risco de adquirir a doença 1.9 vezes maior em relação aos bairros urbanos. A análise dos fatores de risco, considerando a sorologia, demonstrou que os animais residentes em ambiente rural possuem um risco maior de adquirir a infecção e que hábitos dos animais, como livre acesso a rua e função de guarda foram indicativos preditores da infecção por *Leishmania*. A presença de plantações no quintal foi um fato que também contribuiu para a ocorrência da infecção. Marzochi e Marzochi, (1994) relataram que tal característica pode estimular o estabelecimento de flebotomíneos nesses ambientes. Apesar dos proprietários possuírem informações sobre a doença nenhuma medida de prevenção foi por eles adotada.

A eutanásia dos cães baseada nos resultados dos testes sorológicos como forma de controle para LV tem gerado discussões e direcionando a pesquisa de testes cada vez mais sensíveis e específicos. Neste contexto, a demonstração do parasito e/ou DNA ainda é importante, principalmente em determinadas situações, onde os métodos sorológicos provêm resultados imprecisos (Saridomichelakis, 2009). Tanto para a cultura, como para PCR, diferentes amostras biológicas podem ser utilizadas (Fisa et al., 2001; Manna et al., 2004; Moreira et al., 2007; Maia et al., 2009; Ferreira et al., 2012; Lombardo et al., 2012). Embora resultados diversos sejam apresentados na literatura, ainda não existe um consenso da amostra padrão, devendo-se considerar aspectos relacionados à facilidade da coleta da amostra e do método utilizado (Saridomichelakis, 2009). Nesta pesquisa, utilizando a cultura, o diagnóstico da LVC foi melhor obtido utilizando amostras de pele, entretanto, nos cães assintomáticos, a amostra de medula óssea apresentou maior positividade. Nestes casos

a medula óssea foi o único sítio em que se obteve isolamento de *L. chagasi* (artigo nº 1). Paralelo a cultura, a PCR mostrou-se eficaz em detectar infecção por *Leishmania* sp. Dos 430 cães pesquisados, 63 cães foram positivos por esta técnica, anticorpos anti-*Leishmania* sp não foi detectado em 20 cães. A chance de detectar DNA de *L. chagasi* foi superior nos animais sintomáticos quando comparado aos assintomáticos, como descrito por outros autores (Martinez et al., 2011). Considerando a PCR, o aspirado de linfonodo foi o sítio que demonstrou maior positividade para o diagnóstico da LVC, independente do *status* clínico do cão. Esse resultado pode sugerir uma constante parasitemia neste sítio em todas as fases clínicas do cão infectado, indicando predileção deste sítio, como descrito por Maia et al. (2009). Entretanto, apesar de 22 cães terem apresentado úlceras cutâneas, tal amostra biológica apresentou resultado positivo, pela PCR, em 59,1% (n=13), apontando que tal sítio possa ser utilizado na pesquisa de DNA de *L. chagasi*, quando presente nos cães. Os resultados relacionados a utilização da PCR como ferramenta de rastreamento de *L. chagasi* estão apresentados no artigo nº 4 desta tese.

Como forma de verificar a infecção por *L. chagasi* em cães a utilização de testes sorológicos são amplamente difundidos (Almeida et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Santos et al., 2010). Até o ano de 2011, a imunofluorescência indireta (IFI) era o teste confirmatório da LVC, sendo atualmente, substituída pelo teste ELISA (MS, 2011). Como já mencionado anteriormente, a possibilidade de reações cruzadas nos testes sorológicos podem induzir erros em dados relacionados a prevalência da infecção em áreas onde ocorrem outros tripanosomatídeos.

Neste estudo, além de *T. caninum*, descrevemos um caso da infecção por *Trypanosoma cruzi* em um cão residente em Cuiabá, apresentado no artigo nº 6. No estado de Mato Grosso a doença de Chagas ocorre de forma esporádica e na cidade de Cuiabá têm-se relatos apenas do vetor infectado, sem notificação de casos da forma aguda/ou crônica em

humanos ou caninos (Paula et al., 2012). No ciclo domiciliar os cães são considerados importantes reservatórios e, devido a estreita proximidade com o homem, pode representar um fator de risco para a população humana. O caso descrito em nosso estudo foi considerado autóctone e ressalta a importância do correto diagnóstico canino, já que é um animal importante na epidemiologia de diversas zoonoses (Eloy e Lucheis, 2009).

Os resultados apresentados neste estudo contribuem para o conhecimento de aspectos da LVC em Cuiabá e apontam para a necessidade da inclusão de ações educacionais e sanitárias nessa cidade, já que é uma região que possui características propícias à instalação da LV, como já foi observado em outras cidades brasileiras. Com relação ao diagnóstico canino, enfatizamos que a utilização de diferentes amostras clínicas, associadas a diferentes técnicas diagnósticas proporcionam um diagnóstico acurado da LVC e auxiliam o diagnóstico diferencial com outros agentes que possam estar circulando nesses animais.

O diagnóstico da LVC é complexo. Os animais nas áreas endêmicas podem estar em diferentes fases da infecção. Tanto a técnica quanto a amostra biológica empregada pode interferir no diagnóstico da infecção (Martinez et al., 2011). Em nosso estudo os casos sintomáticos de LVC foram melhor diagnosticados independente da técnica utilizada. Entretanto temos que considerar outros aspectos. Embora a IFI tenha diagnosticado um maior número de animais infectados, deve-se ressaltar que é uma ferramenta de diagnóstico indireta e que reações cruzadas podem ocorrer. A presença de *L. chagasi* nos 430 cães estudados oriundos do inquérito foi comprovada em 12 casos pela cultura e em 63 pela PCR. É importante mencionar que pela PCR o aspirado de linfonodo foi o sítio que apresentou maior positividade para o diagnóstico, embora este sítio não tenha sido examinado pela cultura. Considerando a complexidade clínica e epidemiológica da LVC, a utilização de ferramentas com princípios distintos, assim como a investigação de diferentes amostras biológicas de cães suspeitos é critério que, segundo nossa opinião, dever ser adotado.

A sobreposição de áreas endêmicas, além de dificultar o diagnóstico preciso, favorece o aparecimento de infecções mistas e neste estudo contribuimos com o relato da co-infecção por *T. caninum* e *L. chagasi* em dois animais na cidade de Cuiabá, demonstrando que cães podem albergar simultaneamente ambos agentes. É importante também mencionar que o cão doméstico funciona com um dispersor de certas zoonoses, carregando agentes etiológicos de importantes enfermidades (Colwell et al., 2011). A comprovação da infecção natural por *L. chagasi* e o encontro de agentes como *T. caninum* e *T. cruzi* em cães domésticos, são elementos importantes que devem ser considerados na vigilância epidemiológica de Cuiabá.

## 7. CONCLUSÕES

1. A investigação parasitológica, através da cultura, mostrou-se eficaz para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, além de promover o isolamento de outros agentes tripanosomatídeos circulantes em cães, como *Trypanosoma caninum*;
2. Considerando a cultura, a amostra de pele íntegra foi o sítio que apresentou maior positividade na detecção de *L. chagasi* nos cães sintomáticos e a medula óssea nos assintomáticos, demonstrando que o *status* clínico do cão possui influência no resultado da amostra biológica analisada para o diagnóstico parasitológico da LVC;
3. As técnicas de isoenzimas e PCR foram fundamentais para a caracterização dos parasitos das espécies *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma caninum* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente;
4. A soroprevalência para infecção por *Leishmania sp.* foi considerada alta em Cuiabá. O acesso livre à rua, função de guarda, presença de plantações no quintal e, residir em ambiente rural, foram fatores de risco que contribuíram para aquisição da infecção canina nas áreas estudadas;
5. Na PCR, o aspirado de linfonodo poplíteo foi o sítio que apresentou maior positividade para o diagnóstico da LVC, independente do *status* clínico, representando um bom alvo para utilização em inquéritos epidemiológicos;
6. Na infecção por *L. chagasi* ou *T. caninum*, os sinais clínicos apresentados pelos cães não foram considerados como elemento auxiliar para o diagnóstico.
7. A infecção por *L. chagasi*, *T. caninum* e *T. cruzi* diagnosticados em cães domiciliados em Cuiabá demonstram a sobreposição de tais agentes e, considerando tal complexidade, a utilização de ferramentas diagnósticas com princípios distintos deve ser adotado nessa região.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches P, Silva Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santana-Gomes GM, Jans JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991;177: 557-561.
- Alencar JE, Cunha RV. Inquérito sobre o calazar no Ceará. Novos resultados. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1963;15:391-403.
- Alencar JE. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Med de la Universidade Federal do Ceará* 1978;17/18: 129-148.
- Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Sousa VRF. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:156-159.
- Almeida ABPF, Mendonça AJ, Sousa VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Cienc Rural* 2010; 40:1610-1615.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1-88.
- Alves AL, Bevilaqua CML, Moraes NB, Franco SO. Levantamento epidemiológico da leishmaniose visceral em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. *Rev Cienc Animal* 1998;8(2):63-68.
- Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A.O., Madeira, M.F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Research in Veterinary Science*. 2012;93:1329-1333.

- Amora SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ, et al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Cienc Rural* 2006;36:1854-1859.
- Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006;140:231-238.
- 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
- Antonialli SAC, Torres TG, Paranhos-Filho AC, Tolezano J. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *J Infect* 2007;54, 509-514.
- Arias JR, Monteiro P, Zicker F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. *Emerg Infect Dis* 1996;2:145-146.
- Barros JH, Almeida AB, Figueiredo FB, Sousa VR, Fagundes A, Pinto AG, et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106;419-423.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 2008;24(7):324-330
- Baruffa G, Cury P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. *Rev Patol Trop* 1973;2:345-361.

- Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML, et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009;61(5):1035-1043.
- Borja-Cabrera GP, Mendes AC, Souza EP, Okada LYH, Trivellato FAA, Kawasaki JKA, et. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine *Vaccine* 2004;22:2234-2243.
- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop* 2003;45(2):79-83.
- Calabrese KS, Cortada VMCL, Dorval MEC, Souza Lima MAA, Oshiro ET, Souza CSF, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp Parasitol* 2010; 124:253-257.
- Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop* 2010;116:108-110.
- Camiá RP, Rinaldi J, Fontes CJF, Hueb M. Foco de Leishmaniose Visceral em Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32Suppl:27-128.
- Campos-Valdéz QFBG, Barrera-Peña MVZR, Sánchez TLCRLL, Jiménez-Cardoso E, Martínez-Labat P. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in dogs (*Canis familiaris*) from Tlalnepantla Municipality, State of Mexico. *Bioquímica*, 2001; 26(1):6-19
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol*, 2008;38:1533-1543.



- Centro de Controle de Zoonoses. Casos de Leishmaniose visceral humana em Cuiabá. Comunicação pessoal. 2012.
- Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Paumgartten MP, et al. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). Mem Inst Oswaldo Cruz 1938;33: 89-229.
- Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Reis LES, et al. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. PLoS Neglected Tropical Diseases 2011;5:e1291.
- Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 2005;128:149-155
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. Vet Parasitol 2011;182(1):14-21.
- Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(2):232-42.
- Crisante G, Rojas A, Teixeira MMG, Añez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. Acta Trop, 2006;98:247-254.
- Cupolillo E, Grimaldi JrG, Momen HA. General classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg 1994;50:296-311

- D'Alessandro A, 1976. Biology of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*, Tejera, 1920. In: Lumsden WHR, Evans, D.A. (Eds.), *The Biology of the Kinetoplastida*, vol. I, Academic Press, New York, pp. 327-403.
- Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 2006;140:54-60.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet. Parasitol* 2007;149:139-146.
- Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*,2008;1(1):25.
- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences *Trends in Parasitology* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>
- Da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, De Souza EP, Luz KG, Palatinik M, et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 2000;19:1082-1092.
- Duarte, JLS. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral no Município de Rondonópolis, Mato Grosso, 2003 – 2008. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. São Paulo, 2010. 116p
- Eloy LJ, Lucheis SB. Canine trypanosomiasis: Etiology of infection and implications for public health. *J Venom An Toxins incl Trop Dis* 2009;15(4):589-611.
- Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbabosa A, Vazquez-Chagoyan JC, et al. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs. *Mexico Emerg. Infect. Dis*, 2006;12:624-630.

- Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AD, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Inf Dis* 1992;166:1124-1132.
- Faye B, Bucheton B, Bañuls AL, Senghor MW, Niang AA, Diedhiou S, et al. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in a rural area of Senegal: analysis of risk factors involved in transmission to humans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105:333-340.
- Ferreira SA, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, et al. 2012. Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1596.
- Figueiredo MM, Moura EP, Costa MM, Ribeiro VM, Michalick MS, Tafuri WL, et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Histol Histopathol* 2010;25:877-887
- Figueiredo FB, Lima Júnior FEF, Tomio JE, Indá FMC, Corrêa GLB, Madeira MF. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. *Acta Scientiae Veterinariae* 2012;40:1026.
- Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 2001;99:105-111.
- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006;137:214-221.

- Franciscato C, Lopes STA, Teixeira MMG, Monteiro SG, Wolkmer P, Garmatz BC, et al. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 2007;37(1):288-91.
- Franke CR, Greiner M, Mehlitz D. Investigation on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop*, 1994;58(2):159-69.
- França-Silva JC, Costa T, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 111:161-173.
- Gavvani ASM, Mohite H, Edrissian GH, Mohebalı M, Davies, CR. Domestic dog ownership. In Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania Infantum* Am J Trop Med Hyg 2002;67(5):511-515.
- Genaro O, Mayrink W, Michalick MSM, Dias M, Costa CA, Melo MN. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83: 43.
- Gomes YMM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J* 2008;175:45-52.
- Grimaldi Jr G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106:54-59.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
- Hueb M, Assis SB, Guimarães EED, Rosa DL, Fontes CJF. Ocorrência de transmissão autóctone de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;23(3):281-282.

- Ikeda-Garcia FA, Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Clin Veterinária 2006;62:32-38.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Med Vet Entomol 1997;11:105-111.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. (2011) Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoS Negl Trop Dis 2011;5(6):e1155.
- Leblois R, Kuhls K, François O, Schoonian G, Wirth T. Guns, germs and dogs: on the origin of *Leishmania chagasi*. Infect. Genet. Evol. 2011;11:1091-1095.
- Lima LVR, Carneiro LA, Campos MB, Chagas EJ, Laurenti MD, Corbett CEP, et al. Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2010;52:259-265.
- Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Silveira Neto L, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 2010a;173:330-333.
- Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet Parasitol 2012;184:10-17.
- Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta

- sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Braz J vet Res anim Sci.* 2009;46(3):181-187.
- Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M., Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009;87:260-262.
- Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil *Parasitol* 2009a;136:411-423.
- Maia C, Ramada J, Cristovão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 2009;179:142-144.
- Maia C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop* 2010;116:193–199.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:566-567.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004;125:251-262.
- Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L, et al. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors* 2011;4:57.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Souza PP, Toledo LM, et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Publ* 1985a, 1:442-446.

- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Toledo LM, Grimaldi G, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985b;80:349-357.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthropozoonosis and Possibilities for Their Control. Cad Saude Publ 1994;10(supl.2):359-375.
- Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. Rev Soc Bras Med Trop 2009;42:570-580.
- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitol 1999;119: 237-246.
- Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998 -2005. Rev Soc Bras Med Trop 2007;40(1):42-48.
- Mestre GLC; Ribeiro ALM; Miyazaki RD; Rodrigues JSV; Almeida ABPF; Sousa VRF, et al. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. Rev. Bras. Parasitol Vet 2011;20(3):228-234.
- Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2006.
- Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina.2010a.[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tec\\_front\\_br\\_argentina\\_lv\\_final\\_ses\\_rs.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tec_front_br_argentina_lv_final_ses_rs.pdf).

Ministério da Saúde (MS). Nota técnica conjunta nº 01/2011 – CGDT/DEVIT/SUS/MS.

Esclarecimento sobre a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília, DF; 2011.

Ministério da Saúde (MS). Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lt\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lt_casos_05_09_11.pdf). Acesso dia 28/09/2012a.

Ministério da Saúde (MS). Casos de Leishmaniose Visceral Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf) Acesso dia 28/09/2012b.

Ministério da Saúde (MS). Leishmaniose Visceral Americana: Aspectos epidemiológicos.

[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31941](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941). Acesso dia 28/09/2012c.

Ministério da Saúde (MS). Óbitos de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2010.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_obitos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_obitos_05_09_11.pdf) Acesso dia 28/09/2012d.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol 2008;24(8):371-377.

Missawa NA, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Dias ES. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. Cad. Saúde Públ 2010;26(12):2414-2419



- Missawa NA, VMAE, Maciel GBML, Michalsky ÉM, Dias ES. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:76-78
- Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(2):114-117.
- Momen H, Pacheco RS, Cupolillo E, Grimaldi Jr G. Molecular evidence for the importation of old world *Leishmania* into the Americas. *Biol Research* 1993;26: 249-255.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(2):147-152.
- Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparasion of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007;145:245-252.
- Moura ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC, Silva RR. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Science* 1999;36(2):101-102.
- Nunes VLB, Galati EAB, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ESMM, Ishikawa E, et al. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(3):301-302.
- Oliveira LCP, Araújo RR, Alves CR, Mouta-Confort E, López JA, Mendonça-Lima FW. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43:400-404.

- Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, Kaneko O, Uemura H, Kanbara H, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitol Res* 2010;107:727-730.
- Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Minas Gerais, southeast Brazil. *Acta Trop* 1999;72:251-258.
- Paradies P, Sasanelli M, Caprariis D, Testini G, Traversa D, Lia RP, et al. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J* 2010;186:370-373
- Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MCBF, Oliveira GGS, Dos Santos WLC, Pontes-De-Carvalho LC, et al. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop* 1998;69:75-83.
- Paula AM. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas do Estado de Mato Grosso entre 2001 a 2010, 2012.
- 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. *Gac Méd Car* 1948;56:130-34.
- Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A, Barros JHS, et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2010;137:1653-1660.
- Quaresma PF, Murta SMF, Ferreira EC, Rocha-Lima ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania*

- species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Act Trop* 2009; 111: 289-94.
- Queiroz, NMGP, Silveira, RCV, Noronha, ACF, Jr., Oliveira, TMFS, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol* 2011;178:1-8.
- 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 Trop.* 2002;84:189-98.
- Ranjan A, Sur D, Singh VP, Siddique NA, Manna B, Lal CS, et al. Risk factors for Indian Kala-Azar. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:74-78.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis *Res Vet Sci* 2006;81:68-75.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunop* 2009;128:87-95
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Currente Status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007;45:21-25.
- Rondon FCM, Bevilaqua CML, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, et al. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet Parasitol* 2008;155:24-31.
- Rougier S, Hasseine L, Delaunay P, Michel G, Marty P. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2012;186:245-253.

- Salomon OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop* 2010;113:84-87.
- Santos JML, Dantas-Torres F, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCA, et al. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:41-45.
- Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 2009;20:471-489.
- Savani ESMM, Schimonsky BV, Camargo MCGO, D'áuria SRN. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. *Rev Saúde Pública* 2003;37(2):260-262.
- Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Araújo FS, Ilha IMN, et al Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 2005;100(7):739-41.
- Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In Farrel (ed) *World Class Parasites: Leishmania*, 4 Kluwer Academic Publishe Boston, Dordrecht, London. 2002, p. 11-31
- Shrout PE. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Stat Methods Med Res* 1998;7:301-317.
- Silva ES, Roscoe EH, Arruda LQ, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. *Rev Bras Med Vet* 2001;23(3):111-116.
- Silva MR, Rosa ICAS. Levantamento de leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso, Minas Gerais. *Acta Scient Vet* 2005;33(1):69-74.

- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 2011;179:257-261.
- Slappendel RJ, Teske E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Quaterlt* 1997;19:10-13.
- Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitol* 2008;135:1329-1335.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection *Vet Parasitol* 2000;90:37-45
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis *Vet Parasitol* 2009;165:1-18
- Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasit & Vectors* 2012, 5:98
- Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, et al. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Públ* 2003;19:109-118.
- Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras*, 2009;29(2):50-152.

- Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009a;104(8):1181-1182.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011;105:1-6
- Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Jhonson SE, Wilkir DA, Eaton KA, et al. Visceral leishmaniasis in an english foxhound from Ohio research colony. J Am Vet Med Association 1988;193:1089-1092.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24:1596-1599.
- Tassi P, Madonna M, Carli S, Belloli C, De Natale G, Ceci L, et al. Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in dog. Res Vet Sci 1994;56:114-150.
- Thompson R, Lima JWO, Maguire JH, Braud DH, Scholl DT. Climatic and demographic determinants of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil using remote sensing technology for environmental categorization of rain and region influences on Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2002;67:648-655.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osório Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia. Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg 2001;64:119-124
- Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. Diagn Micr Infec Dis 2008;61:23-30

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL. Crossreactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1996;38:177-185.

Yadon ZE, Rodrigues LC, Davies CR, Quigley MA. Indoor and peridomestic transmission of american cutaneous leishmaniasis in Northwestern Argentina: A retrospective Case-Control Study. Am J Trop Med Hyg 2003;68(5):519-526.

World Health Organization (WHO), 2012. Disease Watch Focus: Leishmaniasis. [http://www.who.int/tdr/publications/disease\\_watch/leish/en/index.html](http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/index.html).

## **9. ANEXOS**

### **9.1. Licença CEUA**





## 9.2. Ficha epidemiológica





## Use of Parasitological Culture to Detect *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Naturally Infected Dogs

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida,<sup>1,2</sup> Valéria Régia Franco Sousa,<sup>2</sup> Eveline da Cruz Boa Sorte,<sup>2</sup> Fabiano Borges Figueiredo,<sup>3</sup> Daphine Ariadne Jesus de Paula,<sup>2</sup> Maria Fernanda Aranega Pimentel,<sup>2</sup> Valéria Dutra,<sup>2</sup> and Maria de Fátima Madeira<sup>4</sup>

### Abstract

In Brazil, although the domestic dog is a major target for the control actions for visceral leishmaniasis, knowledge gaps of the *Leishmania* species present in those animals still exist in many endemic areas. The objective of this study was the use of parasitological culture as a diagnosis tool and identification of species of *Leishmania* and other trypanosomatids in the canine population in the city of Cuiaba/Mato Grosso. Biological samples such as blood, intact skin fragments, cutaneous ulcers, and bone marrow were collected during a cross-sectional study and cultured on biphasic medium (Novy-MacNeil-Nicolle [NNN]/Schneider's). *Leishmania* isolates were characterized through isoenzyme electrophoresis. Isolates were obtained from 11.2% ( $n=54$ ) of the 482 animals studied considering the different anatomical sites investigated. *Leishmania chagasi* was confirmed in 8.3% ( $n=40$ ) dogs and *Trypanosoma caninum* in 2.9% ( $n=14$ ). The sample of intact skin presented a higher chance of isolation of *L. chagasi* in symptomatic dogs and bone marrow in asymptomatic dogs ( $p<0.05$ ). The results presented in this study emphasize the value of culture and confirm, for the first time, the circulation of *L. chagasi* in the canine population in different neighborhoods of the city of Cuiaba and broaden the knowledge of the geographical distribution of *T. caninum* in Brazil.

**Key Words:** Diagnosis—Dogs—*Leishmania*—*Trypanosoma*—Vector-Borne.

### Introduction

**L**EISHMANIA CURRENTLY AFFECTS 12 million people around the world (WHO 2008). In the Americas, visceral leishmaniasis (VL) is an endemic disease, and Brazil is the country that contributes with the highest number of cases. In Brazilian territory, the disease is spreading, and dogs are the main domestic reservoir of the etiological agent [*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*] and play a key role in the transmission cycle in urban areas (MS 2006).

One of the control measures for VL recommended in Brazil includes a canine serological survey followed by euthanasia of the seropositive dogs. Such a measure, although applied in endemic areas, has been questioned in view of possible cross-

reactions obtained in serological tests (Coutinho et al. 1985, Vexenat et al. 1996), mainly in areas of overlapping with other trypanosomatids agents (Madeira et al. 2006, 2009b, Silva et al. 2011).

In the state of Mato Grosso (MT), located in central-western Brazil, the first human case of VL was reported in 1973 in the south-central region (Baruffa and Cury 1973); and since then, the disease is spreading mainly associated with migratory process and uncontrolled urban occupation (Mestre and Fontes 2007, Missawa and Borba 2009), as already described for other Brazilian regions (Marzochi et al. 1985, Antonialli et al. 2007). Although the disease has been reported in about 34 municipalities, including the capital (Cuiaba), little is known about the species of *Leishmania* parasites circulating in

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

different hosts and environments, information that is essential both for control actions and epidemiological surveillance.

In this context, considering the importance of the domestic dog in the transmission chain of VL and the lack of information on different aspects of leishmaniasis in Cuiaba/MT, the current study aims at using culture as a diagnostic tool and identification of species of *Leishmania* and other trypanosomatids that may be circulating in the canine population.

## Materials and Methods

### Area and survey design

A cross-sectional study was conducted in the city of Cuiaba (15°35'56.10''S and 56°05'41.62''W), MT, located in central-western Brazil, comprising the neighborhoods Barreiro Branco, Coxipó do Ouro, Osmar Cabral, Bela Vista, and Jardim União, where cases of human VL were reported (data to be published).

The study was conducted in the canine population, sampling was defined by the Epi info 3.3.2 program (CDC, Atlanta, GA), considering canine VL (CVL) prevalence of 8.4% (Mestre and Fontes 2007), 99% confidence interval, and acceptable error of 2%, with the population based on canine census held in 2007. The minimum size was estimated at 430 animals, with dogs of both sexes and aged 6 months or more in the period between 2009 and 2010 being sampled. The exclusion of puppies aged <6 months is due to the risks to sedation procedure in this group. The survey was conducted through home visits, considering a residence for every five. In parallel, dogs that were attended at the Veterinary Hospital (HOVET) of the Federal University of MT with suspected leishmaniasis were also included in the study.

All procedures performed during this study were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation, under the protocol number LW-01/10.

### Animals and biological sample collection

After obtaining informed consent from the owners, the dogs were mechanically restrained and subjected to sedation with ketamine (10 mg/kg) associated with acepromazine (0.2 mg/kg) and grouped in asymptomatic, oligosymptomatic, and symptomatic groups, according to Mancianti et al. (1988) criteria. Blood was collected by cephalic or jugular venipuncture and bone marrow through aspiration of the sternum, after local anesthesia with lidocaine 2%, both with anticoagulants. Intact skin tissue samples (scapular region) and samples from cutaneous ulcers, when present, were obtained by biopsy, after a procedure that included trichotomy, antisepsis, and local anesthesia, collecting fragments of about 3 mm.

### Parasitological culture and characterization by multilocus enzyme electrophoresis

The tissue fragments (skin and cutaneous ulcers) were kept in saline containing 1000 U penicillin, 200 µg streptomycin, and 100 µg 5'-fluorocytosine per milliliter and stored at 4°C for 24 h. Then, the samples were seeded in biphasic medium (NNN/Schneider's) plus 10% fetal bovine serum. Bone marrow and blood (200–300 µL) were seeded directly in the culture medium after collection. All samples were analyzed in

duplicates, incubated at 26°C–28°C, and freshly examined, weekly, during 30 days.

Positive cultures (flagellate trypanosomatid found) were grown to obtain parasite mass and cryopreserved at –196°C under liquid nitrogen. Cultures with promastigote isolates were characterized by isoenzyme electrophoresis (Cupolillo et al. 1994), using five enzymatic loci: 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC.1.1.1.43); phosphoglucose isomerase (EC.5.3.1.9); nucleoside hydrolase (2 loci, EC.3.2.2.1); glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC.1.1.1.49), and phosphoglucomutase (EC.1.4.1.9). Reference samples of *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), and *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) were used in all the electrophoretic runs. Samples with isolates of *Trypanosoma* sp. were analyzed by nested polymerase chain reaction with targets for the region 18S rRNA whose molecular analysis of the amplified products identified all isolates as *Trypanosoma caninum*, as shown by Almeida et al. (2011).

### Data analysis

Data obtained were analyzed by the Epi Info 3.3.2 program (CDC/Atlanta), using the Chi-square test ( $\chi^2$ ) or Fisher Exact Test, when any expected value was  $\leq 5$ , and the odds ratios determined with 95% confidence interval. Correlation with age and clinical characteristics of the animal was made between the different sites where parasite isolation was obtained.

## Results

Four hundred thirty dogs were evaluated during home visits in the neighborhoods of Barreiro Branco ( $n=68$ ) and Coxipó do Ouro ( $n=53$ ), both located in the North region formed by small properties with rural characteristics and in the neighborhoods of Osmar Cabral ( $n=107$ ), Bela Vista ( $n=110$ ), and Jardim União ( $n=92$ ), located in South, East, and North regions with urban characteristics. Fifty-two dogs attended to at HOVET, under spontaneous demand, coming from thirty-four neighborhoods, located in Cuiaba and seven from neighboring municipalities, were studied (Fig. 1).

The average age of the 430 dogs assessed in the survey was 4½ years, ranging from 6 months to 14 years. One hundred fifty dogs of this group were considered oligosymptomatic and 42 symptomatic with clinical manifestations of CVL such as dermatologic (119/62%), being the most common alopecia (69/58%), furfuraceous dermatitis (20/16.8%), cutaneous ulcers (11/9.2%), besides lymphadenopathy (118/61.4%), weight loss (78/40.6%), ophthalmopathy (46/23.9%), splenomegaly (43/22.4%), and onychogryphosis (35/18.2%). The age of the dogs attended to at HOVET ranged from 7 months to 14 years (average = 4 years and 9 months), 17 of them were oligosymptomatic and 29 symptomatic, and their manifestations were as follows: dermatopathy (34/73.9%), as furfuraceous dermatitis (19/55.9%), cutaneous ulcers (10/29.4%), ophthalmopathy (26/56.5%), onychogryphosis (24/52.2%), lymphadenopathy (20/43.5%), weight loss (12/26.1%), and splenomegaly (10/21.7%). The presence of cutaneous ulcers was observed in 27 (5.6%) animals, considering the total group of animals studied.

Parasite isolation was obtained from 54 (11.2%) of the 482 dogs assessed, promastigote and epimastigote forms of which

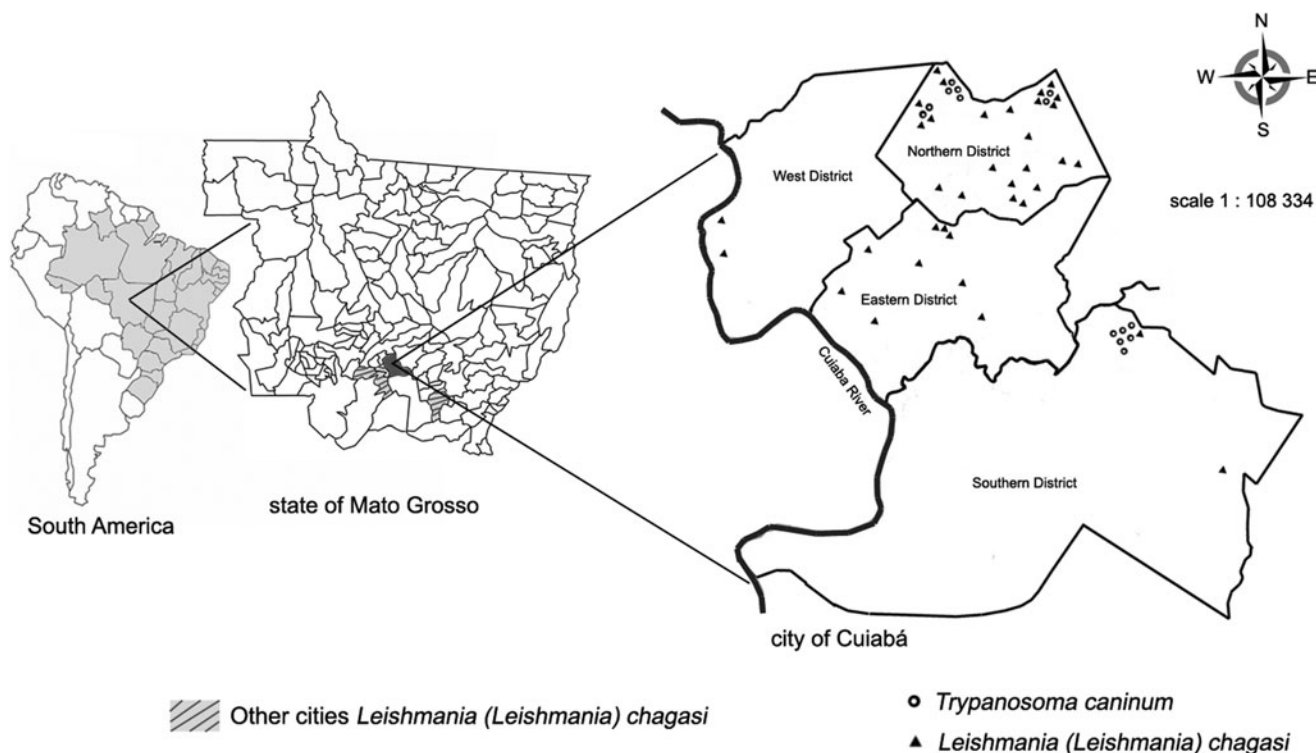


FIG. 1. Spatial distribution of isolates of *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma caninum* detected in dogs in the city of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

were retrieved from 40 and 14 dogs, respectively. *Leishmania* parasites were isolated from blood in 10 cases, bone marrow in 25, intact skin in 28, and cutaneous ulcers in 4. Simultaneous isolations in two or three sites were obtained in 19 cases. Epimastigote forms, identified as *T. caninum*, were exclusively isolated from intact skin from 14 dogs (Table 1). Thirteen (24.1%) animals of this group were oligosymptomatic, and 27 (50%) were symptomatic at the time of the collection. At least 1 isolate per animal from the 81 samples where promastigote forms were isolated was characterized by isoenzyme. All isolates from cutaneous ulcers were identified. *L. chagasi* was identified in 82.7% ( $n=67$ ) samples, from 40

dogs from the different neighborhoods at city of Cuiabá. Seven (17.5%) of those animals lived in neighborhoods located in rural areas and 33 (82.5%) in urban areas. Four of the 28 dogs attended to at HOVET and positive for CVL were from other municipalities such as Nossa Senhora do Livramento (2), Várzea Grande (1), and Rondonópolis (1). Thirty-three (82.5%) dogs were born in the city of Cuiabá, and three (7.5%) in adjacent municipalities, but with permanent residence for over a year (Fig. 1).

Fourteen isolates of *T. caninum* were obtained from dogs living in Cuiabá, of which 11 (78.57%) were reported to have been born in the household (Fig. 1).

The intact skin showed numerically higher parasite isolation in relation to other sites surveyed. Positivity at different sites associated with clinical manifestations and age of the dogs is shown in Table 2.

When the different sites of isolation of *L. chagasi* were compared with the clinical categories studied, we found that in symptomatic dogs, parasite isolation was achieved in all sites examined, the sample of intact skin being statistically superior to blood samples ( $p=0.02$ ; odds ratio 4.02, 1.55–10.76) and lesion ( $p=0.005$ ; odds ratio 5.11, 1.5–19.06); and this difference was not observed for bone marrow ( $p=0.25$ ). The different isolation sites did not present a statistically significant difference ( $p=0.64$ ) in oligosymptomatic dogs. In the group of asymptomatic dogs, *L. chagasi* was isolated only in bone marrow samples, which is statistically significant ( $p=0.02$ ) compared with other sites. High positive correlation ( $r=1$ ) was observed in the different sites related to age and clinical category, thus observing an increase in the number of isolates in adult dogs (>1 year) compared with young dogs (<1 year).

TABLE 1. *LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI* AND *TRYPANOSOMA CANINUM* ISOLATES AND CORRELATION WITH CLINICAL SPECIMENS ANALYZED

Sites of isolation	Number of dogs/ number of isolates
<i>Leishmania chagasi</i> isolates	
Bone marrow	11/11
Skin	10/10
Skin, blood, and bone marrow	7/21
Skin, lesion, and bone marrow	1/3
Skin and lesion	3/6
Skin and bone marrow	5/10
Skin and blood	2/4
Blood and bone marrow	1/2
Total	40/67
<i>Trypanosoma caninum</i> isolates	
Skin	14/14
Total	54/81



TABLE 2. RESULTS OF CLINICAL AND PARASITOLOGICAL DIAGNOSIS (CULTURE) PERFORMED WITH DIFFERENT CLINICAL SPECIMENS OBTAINED FROM 482 DOGS

Dog's date (n=482)	Parasitological test (n/+)			
	Blood	Intact skin	Cutaneous ulcers	Bone marrow
Clinical status and age				
Symptomatic				
<1 year	07 (01)	07 (02)	02 (01)	07 (02)
>1 year	64 (07)	64 (22)	12 (03)	57 (13)
Oligosymptomatic				
<1 year	17 (00)	17 (00)	02 (00)	17 (00)
>1 year	150 (02)	150 (09) <sup>a</sup>	11 (00)	148 (05)
Asymptomatics				
<1 year	42 (00)	42 (03) <sup>b</sup>	00 (00)	42 (01)
>1 year	202 (00)	202 (06) <sup>c</sup>	00 (00)	200 (04)

<sup>a</sup>05 samples identified as *T. caninum*.

<sup>b</sup>03 samples identified as *T. caninum*.

<sup>c</sup>06 samples identified as *T. caninum*.

n, number of samples tested; +, number of positive samples.

## Discussion

In Brazil, VL is a growing disease and coordinated actions, thus involving different segments of the epidemiological chain becoming fundamental for its control. Although cases of human VL have been described in Cuiaba, information about the canine disease is based on the results of serological surveys (Mestre and Fontes 2007, Almeida et al. 2009), with a large parasitological knowledge gap of these animals (Almeida et al. 2010).

Parasitological approaches are not used in epidemiologic studies, mainly due to the large volume of work produced by this activity. However, this practice is essential for knowing and monitoring the agents that may be circulating in endemic areas. In this context, we used the parasitological culture as a diagnostic tool in 482 dogs and we confirmed the presence of *L. chagasi* and *T. caninum* for the first time in the city of Cuiaba.

Forty dogs with different clinical conditions were found to be naturally infected by *L. chagasi*, thus demonstrating the CVL prevalence of 8.3%, a similar result to that found by Mestre and Fontes (2007), using serological data. Parasite isolation in culture is considered a reference standard for diagnosis of leishmaniasis, thus showing high specificity and variable sensitivity, according to culture conditions. One drawback of this technique is the possibility of bacterial or fungal contamination, which in our study was low, found in 23 (1.6%) of the 1462 samples processed for this method.

The use of different biological samples for the diagnosis of CVL has been investigated through different techniques (Madeira et al. 2006, Maia et al. 2009, Assis et al. 2010). Manna et al. (2004) describe the use of aspirates or biopsies of lymph node, spleen, bone marrow, and liver in the detection of DNA of *Leishmania* sp., although they describe samples of blood, skin, and conjunctiva as less invasive and with good results. In this study, the use of skin fragments, blood, and aspirate of bone marrow occurred in 100% and 97.7% of the animals assessed, thus showing good results in relation to the ease of obtaining these clinical samples.

Authors point out the skin as an important site for *Leishmania* detection due to its high parasite load in both asymp-

tomatic and symptomatic animals (Lima et al. 2010, Queiroz et al. 2011). In the study conducted by Madeira et al. (2009a), where 394 dogs seropositive for leishmaniasis were investigated, *L. chagasi* was isolated from the skin in 78% of the animals studied. In the current study, 70% of the isolates with *L. chagasi* were from the skin, thus reinforcing this site as a good target for parasitological investigation of CVL.

Bone marrow was the best site for isolation in asymptomatic dogs, whereas skin was for oligosymptomatic and symptomatic ones. The chance to isolate the agent from the skin of the latter was four or five times greater than from samples of blood or cutaneous ulcer, respectively. According to Tafuri et al. (2001), *L. chagasi* seems to spread initially to organs of the reticulo endothelial system, such as bone marrow, to be found later on the skin, which could explain the fact of *L. chagasi* being isolated only from bone marrow in asymptomatic dogs.

The isolation of *L. chagasi* from different sites in symptomatic dogs proves that the agent spread to various organs of the animal (Madeira et al. 2006, Maia et al. 2009). This fact may be related to the parasite load in symptomatic animals (Lima et al. 2010), thus making it easier to diagnose in this group of animals as proved by Queiroz et al. (2010) when using several methodologies for VL diagnosis in dogs with and without clinical symptoms. For Maia et al. (2009), the infection difference of diverse organs of the same animal may be associated to the potential parasite load and related with the local immune response of the organ. These data show that parasite isolation on a particular site is conditioned to the clinical status of the animal. On the other hand, the long incubation period in VL has been associated with the predisposition of adult dogs to develop the disease (Arias et al. 1996), an aspect that could explain the high correlation found in the isolation of *L. chagasi* in adults dogs evaluated in this study.

Euthanasia of seropositive dogs, with titers equal to or above 1:40 for immunofluorescence tests, is one of the control measures used for VL in Brazil (MS, 2006). However, the possibility of cross-reactions should be considered mainly in areas of overlapping with other agents. The state of MT is considered endemic both for VL and tegumentary leishmaniasis (TL) forms. Although *L. braziliensis* was not isolated from the dogs studied, the circulation of this species should not be disregarded given the small number of dogs with ulcers suggestive of TL evaluated, besides the proved circulation of this agent in the state and the occurrence of TL cases in the municipality of Cuiaba (Carvalho et al. 2006).

Parasite isolation is important for several studies besides confirmation of diagnosis, mainly those involving epidemiological surveillance, thus making it possible, through the characterization of the parasites found, the mapping of the species and/or parasite variants circulating in endemic areas. A fact revealed by this study, obtained by the use of culture method, was the isolation of *T. caninum* for the first time in the city of Cuiaba. This parasite was found in fourteen dogs from four of the five neighborhoods surveyed, from which eleven were born in the house visited. This species was initially described in the municipality of Rio de Janeiro (Madeira et al. 2009b), and these new reports suggest that the parasite may be circulating in different Brazilian regions and emphasize the importance of identifying the species infecting seropositive dogs in endemic areas.

In this study, the 14 samples in which *T. caninum* was isolated were all from intact skin reinforcing a biological



characteristic of this species as already mentioned in other studies (Madeira et al. 2009b, Pinto et al. 2010). In none of these animals, *Leishmania* was isolated in the other sites evaluated. Overlapping in endemic areas for leishmaniasis, occurrence of coinfection (Madeira et al. 2009b), and isolation of *T. caninum* in dogs seropositive for leishmaniasis as observed by Pinto et al. (2010) suggest that surveillance actions should be implemented, considering the interference of such aspects in the prevalence of CVL.

The spatial distribution of *L. chagasi* in Cuiaba demonstrates the circulation of this agent in all administrative districts of the municipality, thus allowing to safely define the transmission areas for VL (Missawa and Borba 2009). The largest number of isolates was obtained in the North district, where human and canine cases have been diagnosed as described by Almeida et al. (2010).

The use of culture in this study confirmed the autochthony CVL cases, and proved the circulation of *L. chagasi* in the canine population in different neighborhoods of Cuiaba as well as in neighboring municipalities. In addition, it provided relevant epidemiological information, thus highlighting the finding of *T. caninum*, first described in the city of Cuiaba.

### Acknowledgments

The authors thank Eduardo da Silva Machado for his technical support in preparation of culture media and isoenzyme technique. This work was supported, in part, by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Mato Grosso and CNPq (process n° 474894/2010-0).

### Disclosure Statement

No competing financial interest exist.

### References

- Almeida, ABPF, Barros, JHS, Sousa, VRF, Boa Sorte, EC, et al. Encontro de *Trypanosoma caninum* em cães, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. In: *Anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Natal-RN, 2011:668.
- Almeida, ABPF, Faria, RP, Pimentel, MFA, Dahroug, MAA, et al. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:156–159.
- Almeida, ABPF, Mendonça, AJ, Sousa, VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Cienc Rural* 2010; 40:1610–1615.
- Antonialli, SAC, Torres, TG, Paranhos-Filho, AC, Tolezano, J. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *J Infect* 2007; 54:509–514.
- Arias, JR, Monteiro, P, Zicker, F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. *Emerg Infect Dis* 1996; 2:145–146.
- Assis, J, Queiroz, NMGP, Silveira, RCV, Nunes, CM, et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19:17–25.
- Baruffa, G, Cury, P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. *Rev Patol Trop* 1973; 2:345–361.
- Carvalho, MLR, Andrade, ASR, Fontes, CJF, Hueb, M, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop* 2006; 98:277–285.
- Coutinho, SG, Nunes, MP, Marzochi, MCA, Tramontano, N. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) were the human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80:17–22.
- Cupolillo, E, Grimaldi, G, Jr., Momen, HA. General classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:296–311.
- Lima, LVR, Carneiro, LA, Campos, MB, Chagas, EJ, et al. Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010; 52:259–265.
- Madeira, MF, Figueiredo, FB, Pinto, AG, Nascimento, LD, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009a; 87:260–262.
- Madeira, MF, Sousa, MA, Barros, JHS, Figueiredo, FB, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2009b; 136:411–423.
- Madeira, MF, Schubach, AO, Schubach, TMP, Pereira, SA, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 138:366–370.
- Madeira, MF, Sousa, MA, Barros, JHS, Figueiredo, FB, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2009b; 136:411–423.
- Maia, C, Ramada, J, Cristovão, JM, Gonçalves, L, et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 2009; 179:142–144.
- Mancianti, F, Gramiccia, M, Gradoni, L, Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82:566–567.
- Manna, L, Vitale, F, Reale, S, Caracappa, S, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004; 125:251–262.
- Marzochi, MCA, Sabroza, PC, Toledo, LM, Marzochi, KBF, et al. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro–Brasil. *Cad Saude Publica* 1985; 1:5–17.
- Mestre, GLC, Fontes, CJF. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998–2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:42–48.
- [MS] Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília DF: Ministério da Saúde, 2006:122.
- Missawa, NA, Borba, JF. Leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no período de 1998 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:496–502.
- Pinto, AGS, Schubach, TMP, Figueiredo, FB, Baptista, C, et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2010; 137:1653–1660.
- Queiroz, NMGP, Assis, J, Oliveira, TMFS, Machado, RZ, et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19:34–40.
- Queiroz, NMGP, Silveira, RCV, Noronha, ACF, Jr., Oliveira, TMFS, et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol* 2011; 178:1–8.
- Silva, DA, Madeira, MF, Teixeira, AC, Souza, CM, et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 2011; 179:257–261.

- Tafuri, WL, Oliveira, MR, Melo, MN, Tafuri, WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 2001; 96:203–212.
- Vexenat, AC, Santana, JM, Teixeira, ARL. Crossreactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996; 38: 177–185.
- [WHO] World Health Organization. 2008. Leishmaniasis. Available at [www.who.int](http://www.who.int) (accessed June 25, 2008).

Address correspondence to:  
*Maria de Fátima Madeira*  
*Laboratório de Vigilância em Leishmanioses*  
*Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas*  
*Fundação Oswaldo Cruz*  
*Av. Brasil 4365*  
*Rio de Janeiro 21045-900*  
*Brasil*

*E-mail: fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br*



## Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?

J.H.S. Barros<sup>a,\*</sup>, A.B.P.F. Almeida<sup>b</sup>, F.B. Figueiredo<sup>c</sup>, V.R.F. Sousa<sup>b</sup>, A. Fagundes<sup>a</sup>, A.G.S. Pinto<sup>a</sup>, C. Baptista<sup>a</sup>, M.F. Madeira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, S/N, campus da UFMT, Boa Esperança, Cuiabá, MT, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 May 2011

Received in revised form 30 March 2012

Accepted 30 March 2012

Available online 10 May 2012

#### Keywords:

Trypanosomatidae

Dogs

18S rRNA gene

Nested-PCR

### ABSTRACT

*Trypanosoma caninum* is a parasite of the *Trypanosoma* genus recently described in the natural infection of dogs in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Suspecting the existence of a natural cycle and the circulation of this new species, the objective of this study was the taxonomic identification of samples of *Trypanosoma* spp. isolated from dogs in different Brazilian regions. Parasites were solely obtained from skin fragments culture and characterized by nested-PCR targeting the partial sequence of 18S rRNA gene and PCR products were sequenced. Thirty-three samples, obtained in São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso and Rio de Janeiro states were analyzed. PCR and sequencing showed that the isolates were genetically identical or closely similar and confirmed *T. caninum* identity. This report broadens the geographical distribution of *T. caninum* in Brazil and discusses the impact of the presence of this parasite in areas of canine leishmaniasis occurrence.

© 2012 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd.

All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Trypanosoma* includes a complex group of parasites that infect a broad range of hosts worldwide. According to the species, they may infect blood or other tissues, under the trypomastigote or amastigote forms, respectively.<sup>1</sup> Recently, a new species, *Trypanosoma caninum*, was described in domestic dogs in the state of Rio de Janeiro, Brazil, isolated into culture from intact skin fragments; attempts to isolate it from blood or other tissues from naturally infected dogs did not succeed.<sup>2,3</sup> Aspects

related to the biological forms present in the vertebrate host and its natural cycle are still unknown. However, molecular characterisation shows it is not related to *T. cruzi* or *T. rangeli*, and analysis of partial SSU ribosomal DNA sequences give *T. pestanaei* and a wombat trypanosome as the closest matches.

In Brazil, visceral leishmaniasis (VL) is a serious public health problem and the domestic dog is one of the targets for control actions because it is considered a major reservoir of *Leishmania* (*L.*) *chagasi* (= *L. infantum*), the VL etiological agent.<sup>4</sup> The Brazilian leishmaniasis control program recommends diagnosis and euthanasia of sera reactive dogs as control measures for VL.<sup>5</sup> In this context, the presence of other trypanosomatids, besides *Leishmania* parasites, infecting domestic dogs in overlapping areas,

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 21 38659541.

E-mail address: [juliana.helena@ipecc.fiocruz.br](mailto:juliana.helena@ipecc.fiocruz.br) (J.H.S. Barros).

may constitute a confounding factor in canine diagnosis, since surveys are based on serological tools for the identification of positive animals.

Our team has monitored *Leishmania* species and the genetic variants that may be infecting domestic dogs,<sup>6</sup> and samples of *Trypanosoma* spp. were isolated during these studies from different Brazilian endemic areas. Morphological and biological aspects of these isolates show patterns very similar to *T. caninum*, however, the correct identification of these isolates is fundamental, since they come from VL endemic areas and evaluating the impact that *T. caninum* has in those areas is still a great challenge. Thus, the objective of this study was to characterize 33 samples of *Trypanosoma* spp. isolated from dogs and report the presence of *T. caninum* in different Brazilian regions, where cases of canine VL occur.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

The samples for this study were obtained during surveys of domestic dogs, the objective of which was the diagnosis of canine VL conducted in the states of Rio de Janeiro, comprising the municipalities of Rio de Janeiro, Niterói and Maricá; São Paulo (Bauru); Minas Gerais (Belo Horizonte); Mato Grosso (Cuiabá) and Goiás (Brasília). In each of these regions dogs were randomly evaluated, dogs of both sexes and aged six months or more being sampled. Only housed dogs participated in the study, and after clinical examination intact skin fragments were collected for parasite isolation in culture and molecular analysis by PCR.

### 2.2. Isolation of parasites from dogs

Three approximately 3 mm sized skin fragments were collected from each animal; two were culture processed and one was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for molecular studies. For isolation in culture the skin fragment was immersed in saline containing 100  $\mu\text{g}$  of 5'fluorocytosine, 1000 IU of penicillin and 200  $\mu\text{g}$  of streptomycin per milliliter and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h according to the protocol described by Madeira et al.<sup>7</sup> After this period, each fragment was transferred aseptically to a biphasic culture medium NNN (Novy-Neal-Nicolle) and Schneider's *Drosophila* medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) containing 10% of fetal calf serum, incubated at  $26\text{--}28^{\circ}\text{C}$  and examined weekly for a maximum of 50 days. The parasites isolated were maintained in the same culture medium, weekly subcultured and expanded in Schneider's medium until reaching about  $10^9$  parasites/mL. The parasites were harvested and twice washed in PBS pH 7.2 and the pellets stored in liquid nitrogen to be used in molecular assays.

### 2.3. Molecular analysis

Genomic DNA of cultured trypanosomes was extracted using DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and for skin samples, the DNA was extracted using Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The manufacturer's instructions were followed in both

procedures. The PCR amplifications were performed in a nested-PCR that targeted a partial sequence of the 18S rRNA gene using oligonucleotides and reaction conditions as described by Smith et al.<sup>8</sup> External primers TRY927F (5' GAAACAAGAAACACGGGAG 3') and TRY927R (5' CTACTGGGCAGCTTGGA 3') were used in the first round and internal primers SSU561F (5' TGGGATAACAAAGGAGCA 3') and SSU561R (5' CTGAGACTGTAACCTCAAAGC 3') were used in the second round. The PCR products were run on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. After PCR, the amplified products obtained in the second round with cultured forms or skin fragments were purified using the QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions and the nucleotide sequences were determined with an automatic sequencer (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All nucleotide sequences obtained in this study were edited by the Bioedit program (BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.2, Ibis Therapeutics; Carlsbad, CA, USA) and analyzed by the Blast program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The similarity percents were obtained comparing the 33 isolates with the sample of *T. caninum* (stock A27) already deposited in the GenBank (Accession no. GU385824).<sup>3</sup> Using the ClustalX program,<sup>9</sup> all sequences studied were aligned and compared each other and with sequences of *T. caninum* and other trypanosomatids available in GenBank.

## 3. Results

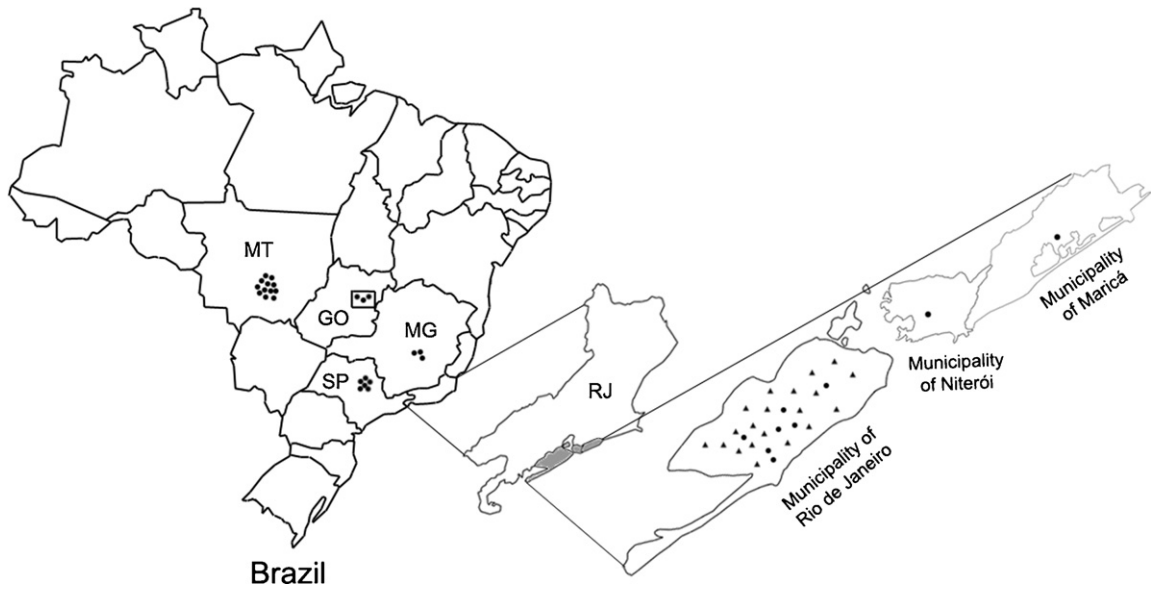
### 3.1. Samples

Thirty-three samples of *Trypanosoma* spp. were isolated from dogs in the states of São Paulo (Bauru,  $n=6$ ), Minas Gerais (Belo Horizonte,  $n=3$ ), Goiás (Brasília,  $n=3$ ), Mato Grosso (Cuiabá,  $n=12$ ) and Rio de Janeiro (Rio de Janeiro,  $n=7$ , Niterói,  $n=1$  and Maricá,  $n=1$ ) during the surveys conducted between 2005 and 2011. All samples were obtained from intact skin cultures, and the geographical location of the animals is shown in Figure 1.

All isolates showed similar morphological aspects in culture, with exuberant growth in NNN/Schneider's medium, although seven samples were lost due to secondary contamination or because of reduced growth through the subcultures of the initial isolate. For this reason, samples of the skin of the animals whose cultures were lost were processed by PCR, using the same protocol as the cultured forms.

### 3.2. PCR and data analysis

The results of PCR assays showed the same amplification pattern for all 33 samples (26 from culture and 7 from skin), with product size of approximately 900 bp for the first round and 700 bp for the second round. The sequencing of the partial 18S rDNA showed that the isolates were genetically identical or closely similar and confirmed *T. caninum* identify. The similarity percents of the isolates and the access number in GenBank are shown in Table 1.



**Figure 1.** Geographical origin of *Trypanosoma caninum* stocks described to date in Brazilian states: MT (Mato Grosso), GO (Goiás), MG (Minas Gerais), SP (São Paulo) and RJ (Rio de Janeiro). Cases described in this study (●) and cases already published by Madeira et al.<sup>2</sup> and Pinto et al.<sup>3</sup> (▲).

**Table 1**

Data of the stocks of *Trypanosoma caninum* analyzed in this study

Sample code	Year of isolation	Localization (State/municipality)	Sample used for characterisation	Accession number GenBank	Similarity <sup>a</sup> (%)
RJ8150	2011	RJ/Maricá	Culture	JF951431	99
RJ002	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907507	99
RJ016	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907508	99
RJ058	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907509	98
RJ066	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907510	99
RJ071	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907531	97
RJ134	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907523	97
RJ4814	2007	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907517	97
RJ4052	2005	RJ/Niterói	Culture	JF907516	96
SP137	2008	SP/Bauru	Culture	JF907518	99
SP269	2008	SP/Bauru	Culture	JF907519	99
SP350	2008	SP/Bauru	Skin	JF907525	99
SP301	2008	SP/Bauru	Skin	JF907526	98
SP385	2008	SP/Bauru	Skin	JF907527	99
SP393	2008	SP/Bauru	Skin	JF907528	99
GO533	2008	GO/Brasília	Skin	JF907529	99
GO705	2008	GO/Brasília	Skin	JF907530	99
GO718	2008	GO/Brasília	Culture	JF907522	99
MG610	2007	MG/Belo Horizonte	Skin	JF907524	99
MG764	2007	MG/Belo Horizonte	Culture	JF907520	99
MG771	2007	MG/Belo Horizonte	Culture	JF907521	99
MT769	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907535	98
MT798	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907536	98
MT799	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907537	99
MT808	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907538	98
MT527	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907511	99
MT531	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907513	99
MT534	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907532	98
MT576	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907514	97
MT577	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907515	96
MT604	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907512	98
MT669	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907533	99
MT732	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907534	98

<sup>a</sup> The similarity percents were obtained comparing the 33 isolates with the sample of *T. caninum* stock A27 (accession no. GU385824) by Blast program. GO: Goiás, MG: Minas Gerais, MT: Mato Grosso, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo.



#### 4. Discussion

The *Trypanosoma* genus comprises numerous species already described and associated to different hosts. This study gives information about *Trypanosoma caninum*, a new species of this genus, about which little is known, identified in canine natural infection. This parasite was described in the municipality of Rio de Janeiro in 2003<sup>2</sup> and now, for the first time, we report the presence of this parasite in the states of São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso and Goiás, which added to the cases already described in the state of Rio de Janeiro<sup>2,3</sup> gives a total of 53 cases of canine natural infection by this parasite. These data clearly show the circulation and the existence of a natural cycle of *T. caninum* and calls attention to an epidemiological scenario newly described in Brazil.

Most of the time *T. caninum* was isolated from healthy dogs, suggesting that this parasite might be non-pathogenic in dogs, although this fact has not been investigated since one dog presented clinical signs compatible with canine VL. It is a matter of concern that *T. caninum* might stimulate the humoral immune system of infected dogs, producing specific antibodies that might cross-react with *Leishmania* in serological tests. This hypothesis is based on the reports of Pinto et al.<sup>3</sup> and Silva et al.<sup>10</sup> who isolated *T. caninum* from seroreactive dogs which were euthanized by leishmaniasis control programs in the municipality of Rio de Janeiro although *Leishmania* parasites were not isolated from these animals. The cross reactivity between different trypanosomatids, e.g., *Leishmania* and *T. cruzi* in canine infection has already been reported.<sup>11</sup> Considering that VL is a growing disease in Brazil<sup>5</sup> and that the domestic dog has a relevant role in the transmission cycle, this hypothesis, if true, will deeply impact VL control and will initiate discussions on canine euthanasia based solely on serological tests.

The fact of *T. caninum* being recently described may be related to the anatomical site where this parasite has been isolated, since the parasites of *Trypanosoma* genus are not usually searched for in the skin. In addition, few studies use intact skin in the diagnosis of canine VL. Fortunately, our team has used this site for canine VL diagnosis for many years,<sup>12</sup> which allowed isolation and identification of this new *Trypanosoma* species. All the samples of *T. caninum* obtained up to this moment were isolated exclusively from this site; all the attempts of isolation from hemoculture failed.

In this study, we demonstrate that the analysis of partial SSU ribosomal DNA sequence was enough to taxonomically identify the 33 samples isolated from different Brazilian regions and grouped all stocks reported to date in a single clade (data not shown). Although the *T. pestanai* and the wombat trypanosome appear to be the most similar trypanosomes, only part of the partial 18S sequences can be aligned with some reliability, and the *T. caninum* sequence is substantially different from others within this group. Biological aspects had already revealed similar patterns between the samples described in this study and the sample of *T. caninum* (stock A27) previously described by Madeira et al.<sup>2</sup> It is important to mention that the molecular target selected in this study to characterize

the samples isolated in culture, was also able to amplify the DNA of *T. caninum* in skin fragments, showing that PCR directed to a selected target can be a useful tool for the molecular tracking of this parasite directly in different clinical samples of dogs from endemic areas. Therefore, with regards to this point and considering the limited sensitivity of culture, further study, using molecular approach on blood samples and other anatomical sites in dogs naturally infected by *T. caninum* is in progress.

Numerous aspects of *T. caninum* biology and epidemiology need to be investigated, e.g., the morphology of the forms present in the vertebrate host; the transmission vector; the possible pathogenic potential for dogs; the prevalence of this parasite; and the impact that its presence may cause in areas where other trypanosomatid species occur, especially those of the *Leishmania* genus.

The observation of autochthonous cases of infection by *T. caninum* in different VL areas in Brazil is an alert for epidemiological surveillance. An overlapping geographical distribution of both *T. caninum* and *Leishmania* parasites indicates the need for techniques to ensure the identification and differentiation of these agents in canine infection.

Considering the lack of information that we have about this new parasite, and the importance of such knowledge in the context of public health, studies to evaluate the serological cross reactivity between *T. caninum* and *L. chagasi* and description of the genetic polymorphism among *T. caninum* stocks are in progress and aim to clarify more aspects of this new parasite.

**Authors' contributions:** JHSB and MFM conceived and designed the study. JHSB drafted the manuscript. MFM critically revised the manuscript for intellectual content. ABPFA, FBF and VRFS conducted fieldwork and analysed the data. AF, AGSP and CB participated in the laboratory tests and interpreted the data. All authors read and approved the final version. JHSB and MFM are the guarantors of the paper.

**Acknowledgements:** We thank Arlene BM Paula Ferreira de Almeida for the inestimable help in the preparing the map. We also thank the Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS-Fiocruz) for supporting the sequencing of the samples in this study. This research is part of the PhD thesis in Clinical Research in Infectious Disease of Juliana Helena da Silva Barros in the program of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**Funding:** This study was partly supported by the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Programa de Incentivo à Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico - PIPDT/2009) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process nº 474894/2010-0).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** The collection of biological samples of dogs was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ), license numbers L-023/06 and LW-1/10.

## References

1. Hoare CA. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
2. Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2009;**136**:401–13.
3. Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2010;**26**:1653–60.
4. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007;**149**:136–46.
5. Ministério da Saúde. Manual for the surveillance and control of visceral leishmaniasis [in Portuguese]. Brasília: Ministério da Saúde: 2006.
6. Coutinho CR, Santos DO, Baptista C, Figueiredo FB, Madeira MF. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil by multilocus enzyme electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011, <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000049>.
7. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006;**138**:366–70.
8. Smith A, Clark P, Averis S, et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitol* 2008;**135**:1329–35.
9. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Ac Res* 1997;**24**:4876–82.
10. Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 2011;**179**:257–61.
11. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009;**164**:118–23.
12. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009;**87**:206–62.

## FULL ARTICLE

### Canine Visceral Leishmaniasis: Seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

Leishmaniose Visceral Canina: Soroprevalência e fatores de risco em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida<sup>1,2\*</sup>; Valéria Régia Franco Sousa<sup>2</sup>; Felipe Augusto Constantino Seabra da Cruz<sup>2</sup>; Magyda Arabia Araji Dahroug<sup>1</sup>; Fabiano Borges Figueiredo<sup>3</sup>; Maria de Fátima Madeira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz - IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz - IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz - IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**\*Corresponding author:** Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida

Hospital Veterinário da UFMT, Departamento de Clínica Médica Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso. Av. Fernando Correa da Costa, 2367, CEP 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

e-mail: [arleferreira@gmail.com](mailto:arleferreira@gmail.com)

#### Abstract

In Brazil, canine visceral leishmaniasis (CVL) is endemic and the number of cases in humans and dogs has increased in the Midwest region. A transversal study was carried out in endemic areas from Cuiabá, State of Mato Grosso, to assess data on seroprevalence and risk factors associated to canine infection. Four hundred and thirty



(430) dogs were randomly evaluated through indirect fluorescence antibody test (IFAT) considering variables related to the animals, the environment and the knowledge by owners on CVL aspects and control. From 430 dogs, 95 (22.1%) were seroreagent for leishmaniasis and animals living in rural environments present risk 1.9 times higher for acquiring the disease than those in urban environments ( $p=0.01$ ; OR 1.9). Factors related to animals' habits, such as free access to the street and guard function were considered indicators to predict infection by *Leishmania* sp. ( $p < 0.05$ ) by statistical univariate analysis. The presence of agricultural activities was also a fact that contributed for the insurgence of the infection ( $p = 0.02$ ; OR 1.68). The results contributed to the knowledge on the aspects of CVL in Cuiabá and point to an urgent need to include educational and sanitary programs in the city, since the region presents favorable characteristics for spreading the infection of CVL as already observed in other Brazilian cities.

**Keywords:** Canine visceral leishmaniasis, dogs, risk factors, infection, Brazil.

## Resumo

No Brasil, a leishmaniose visceral canina (CLV) é endêmica e, na região Centro-Oeste, o número de casos em humanos e cães tem aumentado. Um estudo transversal foi realizado em áreas endêmicas de Cuiabá (MT) com objetivo de avaliar dados sobre a soroprevalência e determinar os fatores de risco associados à infecção canina. Quatrocentos e trinta (430) cães foram aleatoriamente avaliados pelo teste de imunofluorescência indireta, considerando-se variáveis relacionadas aos animais, o ambiente e o conhecimento por parte dos proprietários sobre aspectos da CLV e seu controle. Dos 430 cães, 95 (22,1%) apresentaram-se soros reagentes para leishmaniose, e os animais que viviam em ambiente rural apresentaram risco 1,9 vezes maior de adquirir a infecção dos que aqueles em ambiente urbano ( $p = 0,01$ ; OR 1,9). Fatores relacionados aos hábitos dos animais, tais como o livre acesso à rua e função de guarda, foram considerados indicadores para prever a infecção por *Leishmania* sp. ( $p.<0,05$ ) em análise estatística univariada. A presença de atividade agrícola foi também um fato que contribuiu para a ocorrência da infecção ( $p = 0,02$ ; OR 1,68). Os resultados contribuem para o conhecimento sobre os aspectos da CVL em Cuiabá e apontam para uma necessidade urgente de incluir ações educativas e sanitárias na cidade, já que a região

possui características favoráveis para a dispersão da doença como já observado em outras cidades.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral canina, cães, fatores de risco, infecção, Brasil.

## Introduction

In Brazil, the country with the highest register of cases of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) in the Americas (WHO 2008), the disease is caused by *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*). In the transmission chain, wild and domestic dog reservoirs and two species of Phlebotominae: *Lutzomyia longipalpis* and *L. cruzi* (MS, 2006) are be highlighted.

The chronic disease is the most severe clinical form of leishmaniasis and a serious problem for Brazilian public health, mainly due to the high prevalence and increased number of cases in humans and dogs in urban and suburban areas of large cities (ARIAS et al., 1996; MORENO et al., 2005; MARZOCHI et al., 2009). CVL urbanization has been associated to migration processes linked to the deterioration of social and economic conditions of the population (ANTONIALLI et al., 2007; HARHAY et al., 2011). Thus, an expansion of the disease to areas considered non-endemic has also been noticed in several Brazilian regions (De PAULA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). In the State of Mato Grosso (MT), in the Midwest region of country, the first report of human leishmaniasis dates from 1973 (BARUFFA; CURY, 1973); however, dissemination of the disease to many municipalities was observed in 1998, including Cuiabá, the capital city of the state (MESTRE; FONTES, 2007). In 2010, 313 cases of human visceral leishmaniasis (VL) were registered in Midwestern Brazil, with the State of Mato Grosso contributing with 54 cases (MS, 2011).

Many risk factors to the occurrence of CVL have been determined, indicating possible interactions between the links that compose the epidemiological chain, such as vector, host, reservoirs and environment (GAVGANI et al., 2002; MURRAY et al., 2005; RANJAN et al., 2005; AMORA et al., 2006; RONDON et al., 2008). Thus, the knowledge of the disease distribution in endemic areas and possible associations between the disease and determinant factors may be helpful in control strategies (FREHSE et al., 2010). In this context, the domestic dog plays an important role,

maintaining and spreading the disease. For this reason, factors that may be associated to the risk of infection to these animals must be well known (DANTAS-TORRES, 2009).

Thus, this research investigated the seroprevalence of CVL and the main risk factors associated to the infection of domestic dogs in the following neighborhoods: Barreiro Branco, Coxipó do Ouro, Osmar Cabral, Bela Vista and Jardim União, which are endemic areas in Cuiabá (MT), where cases of human disease have been reported.

## **Materials and Methods**

### *Study Area*

Transversal study carried out in Cuiabá (MT), from July 2009 to December 2010. The municipality is located at the following coordinates: 15°35'56.10''S and 56°05'41.62''O, comprising an area of 3,538 km<sup>2</sup>, 165 meters above sea level, with predominant savanna vegetation. It presents hot and sub-humid tropical climate with 1750 mm average annual rainfall and maximum temperature around 43°C during the warmest months and minimum temperature between 12°C and 14°C. Cuiabá has a population of 551,098 inhabitants; it is subdivided in four regions (IBGE, 2011). The evaluation of the dogs was performed in the neighborhoods located in the North region (Barreiro Branco and Coxipó do Ouro), which present rural characteristics, and in the neighborhoods located in the South, East and West regions: Osmar Cabral, Bela Vista and Jardim União, respectively, with urban environmental characteristics. Cases of human VL have already been described (data not published) in all the neighborhoods studied.

### *Description of the animals*

Four hundred and thirty dogs of both genders and age equal or greater than six months were investigated. Canine sampling was defined considering disease prevalence of 8.4% (MESTRE; FONTES, 2007), with a significance level of 2% and 99% confidence interval based on the 2007 canine census. The survey was conducted through home visits, considering one residence for every five. After obtaining the owners' consent, the dogs were examined and clinically grouped according to Mancianti

et al. (1988) for CVL in asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic. About 5mL of blood were collected from each animal by cephalic or jugular puncture; the serum was then separated by centrifugation and kept at -20 °C until serological test performance. This experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the 'Oswaldo Cruz' Foundation - protocol n° LW-01/10.

#### *Serological Test for Diagnostics - Indirect Fluorescence Antibody Test –IFAT*

The serological analysis was carried out by IFAT technique using a commercial canine visceral leishmaniasis kit (BioManguinhos<sup>®</sup>/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) following manufacturer's recommendations. The serum samples were diluted to the double from 1:40 to 1:640, samples with titer equal or superior to 1:40 were considered reagent, using control sera (positive and negative) included in the tests as reference.

#### *Studied variables*

Information was collected from the owners of the animals in order to describe the general and individual characteristics of the canine population and their environment, as well as to determine the risk factors associated to canine leishmaniasis infection in Cuiabá (MT). The following variables were considered: race (when it could be defined); gender (male, female); age ( $\leq 1$  year, 1 to 3 years, 3 to 6 years,  $>6$  years, and indefinite); house role (guard, hunt, company); and animal habitat (limited to the interior of the house, peridomiciliar, free access to the street). The variables related to the household environment were the following: household close to agricultural activities; presence of other domestic animals (yes / no); presence of trees and animal breeding at the yard (yes / no); public garbage collection (yes/ no); and knowledge on the occurrence of canine and human VL in the neighborhood (yes / no).

#### *Statistical Analysis*

The chi-square with Yate's correction and Fisher's exact test was used to test for associations between all of the parameters (Epi Info software, version 3.5.1, Center for Disease Control, Atlanta, USA). Differences were considered significant for P-values  $<$

0.05. Any parameters statistically linked to seropositivity were used in a logistic regression model to assess risk factors associated with seropositivity results.

## Results

From the 430 dogs studied, 95 were seropositive to the IFAT tests showing 22.1% prevalence of CVL. Considering the origins of the animals, those from neighborhoods located in urban areas represented 18.8% of prevalence and in rural neighborhoods, 30.6% of prevalence, which was statistically significant ( $p = 0.01$ ) (Table 1).

The serological titers presented the following frequency: 1:40 ( $n = 27$ ; 28.4%), 1:80 ( $n = 32$ ; 33.7%), 1:160 ( $n = 16$ ; 16.8%), 1:320 ( $n = 6$ ; 6.3%), 1:640 ( $n = 14$ ; 14.7%).

From 95 seropositive dogs, 44 (46.3%), 35 (36.8%) and 16 (16.8%) were clinically classified as asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic, respectively, with statistical significance between symptomatic and asymptomatic dogs ( $p = 0.008$ ). The most frequently clinical signs were related to the skin ( $n = 37$ ; 38.9%), such as dull fur, generalized alopecia, cutaneous ulcers and scaling followed by lymphadenomegaly ( $n = 34$ ), loss of weight ( $n = 24$ ), splenomegaly ( $n = 18$ ), vision disorders ( $n = 14$ ), onychogryphosis ( $n = 13$ ), apathy ( $n = 12$ ), muscular atrophy ( $n = 4$ ), and cachexia ( $n = 2$ ).

The association of CVL between gender, age or race was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). Six out of the 14 dogs were Pit Bulls, three were Pinschers and there was one of each of the following races: Brazilian Fila, Rottweiler, Poodle, Cocker Spaniel and Chow Chow. The fur type characteristic was also not significant for the occurrence of infection in the dogs; however, variables such as access to the street, guard role and staying most of the time outside the house, represented predictive characteristics for CVL in univariate analysis when compared with dogs kept inside or around the houses (Table 2).

Regarding to the origin of CVL seropositive dogs, 87 (91.6%) were from Cuiabá, eight (8.4%) from neighbor municipalities and one from another State (Mato Grosso do Sul). Seventy-five (78.9%) were living with the family for over a year. The presence of other domestic animals and livestock in the rural area did not present association with seroreactivity for leishmaniasis ( $p > 0.05$ ); in contrast with the presence of crops around

the household (uni and multivariate analysis), which was statistically significant (Table 3).

Knowledge about the CVL disease was reported by 69.3% (n = 298) of dog owners. Interestingly, 75 (78.9%) seropositive dogs were allocated in this group and this datum was considered significant in univariate analysis (p=0.02). Public garbage collection was reported in three neighborhoods located in urban areas and in one neighborhood located in a rural environment (Coxipó do Ouro), but just as a sporadic activity. In the neighborhood where garbage collection service was not a usual practice, a significant statistical difference to this variable (p = 0.02 and OR 4.53) was observed among the rural neighborhoods. Vaccines against CVL, as well as collars impregnated with insecticide, were not usual practices among dog owners for this disease control.

## Discussion

Several epidemiological studies have been carried out on the importance of the dog as *L. infantum* reservoir in Brazil aiming to determine CVL prevalence in endemic and non-endemic areas (DANTAS-TORRES et al., 2006; SILVA et al., 2008; CRUZ et al., 2010; FREHSE et al., 2010). The present survey and serological analysis through IFAT detected the infection of *Leishmania* sp. in 95 (22.1%) of dogs in Cuiabá, where CVL was recently installed. This rate of prevalence was higher than data reported in other studies accomplished in the same municipality (MESTRE; FONTES, 2007; ALMEIDA et al., 2009), and the reason may be that there were human cases of the disease reported in the same neighborhood. According to Marzochi et al. (2009), the canine disease tends to precede human cases, which are kept high in endemic areas. The presence of about 22% of leishmaniasis seropositive dogs is an important datum for the epidemiological surveillance of Cuiabá. Studies conducted in this city have already demonstrated the expansion of the canine disease even to areas even where no human cases have been reported (ALMEIDA et al., 2009).

Historically, VL originates from rural environments where epidemiological patterns facilitate the circulation of the agent. However, the urbanization of this disease is a fact observed in many Brazilian states, where control is seen as more complex (NASCIMENTO et al., 2008). The elevated prevalence determined in dogs from urban

neighborhoods confirms the urbanization trend of VL in Cuiabá. However, it is important to highlight that rural neighborhoods hold the highest canine infection rate, representing a risk 1.9 times higher of acquiring the disease than in urban neighborhoods.

One of the visceral leishmaniasis control measures in Brazil is the elimination of seropositive dogs regardless of the clinical condition (MS, 2006). In the epidemiological context, asymptomatic dogs are also important, representing a prevalence rate of 46.3% of seropositivity for CVL in the present study. As described in other Brazilian regions, the proportion of asymptomatic infected dogs has demonstrated significant prevalence when compared to clinically symptomatic dogs (DANTAS-TORRES et al., 2006).

Due to the importance of domestic dogs in the VL transmission cycle, risk factors for the occurrence of the canine infection have been widely analyzed (AMORA et al., 2006; RONDON et al., 2008). Variables such as gender, age, race and fur type evaluated in the present study were not associated to the risk of acquiring the infection. This was also observed in other endemic areas (RONDON et al., 2008; SANTOS et al., 2010), although some studies present conflicting results as to the gender, age and race variables (OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010). In this matter, there are no diagnostic tests for CVL that present 100% specificity and sensibility. The accuracy indices of these tests may vary as a function of the group studied and the criteria adopted to establish positive and negative gold standards (LUCEY; WEINA, 2008). Results of the IFAT - which is a serological method indicated by the Brazilian Ministry of Health (MS, 2006) to confirm CVL - were used in this study. Despite the fact that, theoretically, any dog can develop the infection, a bimodal distribution of the canine infection has been described (DANTAS-TORRES et al., 2006), with peak of cases in dogs under three years of age and dogs between eight and ten years old, in accordance with observations of this study, where dogs under three years old were the most affected by the infection.

According to Santos et al. (2010), the local environment and risk factors may vary from one region to another, highlighting the mode of life of animals as one of the most important aspects to acquire CVL infection. In the present study, the statistical univariate analysis showed that guard role, free access to the street and living around the exterior of the house were factors associated to dog infection with risks 1.78, 1.89, 3.19 times higher for acquiring the disease, respectively. Such characteristics expose the

animals to a bigger contact with the vector and, consequently, to the infection (AMORA et al., 2006; RONDON et al., 2008).

Environments degraded by disordered occupation have been described as another risk factor that facilitates the occurrence of CVL (MISSAWA; BORBA, 2009; MARZOCHI et al., 2009). The highest indexes of IFAT seropositive animals were observed in the neighborhoods located in rural environments and in the Jardim União neighborhood, which presented severe natural ecotope changes and where human cases of the disease were reported (personal communication). The Jardim União neighborhood is located next to a forest region; however, this variable was not considered as a risk factor for CVL in this study. In addition, the occurrence of the disease in men was statistically associated with cases where the dogs remained inside the home (GAVGANI et al., 2002; BORGES et al., 2009) and the presence of livestock in the property; such relation was not found here, though. In contrast, the presence of agriculture crops around the household was associated to canine leishmaniasis infection with a 1.68 risk of disease occurrence. This characteristic can stimulate the establishment of sand flies in these environments (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Although cases of human and canine VL were previously reported in this area (MESTRE et al., 2011), the knowledge about these cases by the owners interviewed did not indicate a protection factor, on the contrary, it doubled the chances of their dogs acquire the infection. The lack of garbage collection represented a risk factor (OR 4.53) for the occurrence of dog infection in the Barreiro Branco neighborhood when compared to Coxipó do Ouro, where such service is provided. As observed by Moreno et al. (2005), the lack of public garbage collection tends to predispose the occurrence of infection by contributing to the proliferation of the *L. longipalpis*.

Although CVL autochthony is known in Cuiabá (ALMEIDA et al., 2010; 2011), the maintenance of high levels of seropositive dogs in areas with occurrences of the disease reinforces the importance of epidemiological surveillance, as well as the knowledge of the risk factors associated to the canine infection, as a way to clarify the gaps that may be involved in the maintenance of the transmission cycle. In this study, despite the fact that the inhabitants know about the leishmaniasis control, no measure has been adopted by the government. This study contributes to the knowledge on the aspects of canine visceral leishmaniasis in Cuiabá and indicates the need to start educational and sanitary programs in this city.



## Acknowledgements

The authors are grateful to the 'BioManguinhos' Institute - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, for providing the indirect immunofluorescence kits used in this research. This work was supported, in part, by grants from the 'Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso' and 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' - CNPq (process nº 474894/2010-0).

## References

Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Sousa VRF. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(2): 156-159.

Almeida ABPF, Mendonça AJ, Sousa VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Cienc Rural* 2010; 40(7): 1610-1615.

Almeida ABPF, Sousa VRF, Boa-Sorte EC, Figueiredo FB, Paula DAJ, Pimentel MFA, et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(12): 1555-1560.

Amora SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ, et al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Cienc Rural* 2006; 36(6): 1854-1859.

Antoniali SAC, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *J Infect* 2007; 54(5):509-514.

Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 1996; 2(2): 145-146.

Baruffa G, Cury P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. *Rev Patol Trop* 1973; 2(1): 345-361.

Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML, et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61(5): 1035-1043.

Cruz I, Acosta L, Gutiérrez MN, Nieto J, Cañavate C, Deschutter J, et al. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect Dis* 2010; 10(342): 1-7.

Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 140(1-2): 54-60.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vector* 2009; 2(S1): 1-8.

De Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(1): 77-78.

Frehse MS, Greca Júnior H, Ullmann LS, Camossi LG, Machado JG, Langoni H, et al. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19(1): 62-64.

Gavvani ASM, Mohite H, Edrissian GH, Mohebal M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania Infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(5): 511-515.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 2011; 27(9): 403-409.

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. *População da cidade de Cuiabá em 2010*. [cited 2011 Sept 12]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>.

Lucey C, Weina PJ. Applying the STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) checklist to the 2007 Transfusion article 'Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors'. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(2): 155-160.

- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82(4): 566-567.
- Marzochi MCA, Marzochi, KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthropozoonosis and Possibilities for Their Control. *Cad Saúde Públ* 1994; 10(S2): 359-375.
- Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(5): 570-580.
- Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1): 42-48.
- Mestre GLC, Ribeiro ALM, Miyazaki RD, Rodrigues JSV, Almeida ABPF, Sousa VRF, et al. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(3): 228-234.
- [MS] Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2006. 122pp.
- [MS] Ministério da Saúde, 2011. *Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas*. 1990 a 2010. [cited 2011 Sept 17]. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf).
- Missawa NA, Borba JF. Leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, estado de Mato Grosso, no período de 1998 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(5): 496-502.
- Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(6): 456-463.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366(9496): 1561-1577.
- Nascimento ELT, Martins DR, Monteiro GR, Barbosa JD, Ximenes MFFM, Maciel BL, et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil.

Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. *Cad Saúde Públ* 2008; 24(12): 2964-2967.

Oliveira LCP, Araújo RR, Alves CR, Mouta-Confort E, López JA, Mendonça-Lima FW. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(4): 400-404.

Ranjan A, Sur D, Singh VP, Siddique NA, Manna B, Lal CS, et al. Risk factors for Indian Kala-Azar. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(1): 74-78.

Rondon FCM, Bevilaqua CML, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, et al. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 155(1-2): 24-31.

Santos JML, Dantas-Torres F, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCA, et al. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(1): 41-45.

Silva MR, Marques MJ, Romanha AJ, Santa-Rosa ICA, Carneiro CM, Reis AB. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saúde Públ* 2008; 24(2): 281-286.

Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(8): 1181-1182.

[WHO] World Health Organization. 2008. *Leishmaniasis*. [cited 2010 May 28]. Available from: [www.who.int](http://www.who.int).

**Table 1.** Serological prevalence and risk factors associated with Canine Visceral Leishmaniasis infection according to different neighborhoods in the city of Cuiabá State of Mato Grosso.

Neighborhoods	Dogs		IFAT positive dogs		OR (CI 95%)	P-value*
	(n)		n	%		
<b>Rural Area</b>						
Barreiro Branco	68		29	42.64	4.18 (1.59-11.31)	0.002 <sup>b</sup>
Coxipó do Ouro	53		08	15.09		
<b>Total Rural Area</b>	<b>121</b>		<b>37</b>	<b>30.6</b>	1.91 (1.15-3.17)	0.01 <sup>a</sup>
<b>Urban Area</b>						
Bela Vista	110		20	18.18		
Jardim União	92		25	27.17	2.7 (1.22-6.05)	0.01 <sup>c</sup>
Osmar Cabral	107		13	12.14		
<b>Total Urban Area</b>	<b>309</b>		<b>58</b>	<b>18.8</b>		
<b>Total</b>	<b>430</b>		<b>95</b>	<b>22.1</b>		

<sup>a</sup>analysis between urban and rural areas; <sup>b</sup>analysis between the neighborhoods Barreiro Branco and Coxipo do Ouro; <sup>c</sup>analysis between the neighborhoods Jardim União and Osmar Cabral; OR- *Odds Ratio*; \* chi-square with Yate's correction and Fisher's exact test

**Table 2.** Univariate analyses for variables considered for the study of risk factors associated with Canine Visceral Leishmaniasis in 430 dogs from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil

Variables	IFAT positive		IFAT negative		OR (CI 95%)	P- value*
	dogs		dogs			
	(n=95)		(n=335)			
	n	%	n	%		
<b>Gender</b>						
Male	56	58.9	175	52.2	0.76 (0.44-1.20)	0.29
Female	39	41.1	160	47.8		
<b>Age groups</b>						

≤ 1	11	11.6	52	15.5		0.41
≥ 1 – 3	33	34.7	131	39.1		
≥ 3 – 6	32	33.7	82	24.5		
≥ 6	15	15.8	50	14.9		
Indefinite age	04	4.2	20	6.0		
<b>Breed</b>						
SRD	81	85.3	268	80	0.69 (0.36-1.29)	0.31
CRD	14	14.7	67	20		
<b>Fur</b>						
Short	79	83.2	275	82.1	0.92 (0.48-1.67)	0.92
Long	16	16.8	60	17.9		
<b>House role</b>						
Guard	48	50.5	136	40.6	1.78 (1.05-3.01)	0.03 <sup>a</sup>
Company	33	34.7	166	49.6		
Both	13	13.7	32	9.6		
Hunt	1	1.1	1	0.3		
<b>Dog habitat</b>						
Intradomestic	1	1.1	5	1.5		
Peridomiciliar	90	94.7	289	86.3	3.19 (1.06-10.80)	0.03 <sup>b</sup>
Both	4	4.2	41	12.2		

SRD - Without defined Race; CRD With defined Race; OR - *Odds Ratio*; <sup>a</sup>analysis between function of guard and company; <sup>b</sup>analysis between peridomicile and both; Intradomestic (limited to the interior of the house); \* chi-square with Yate's correction and Fisher's exact test

**Table 3.** Univariate and multivariate analyses to detect risk factors associated with the IFAT positivity of Canine Visceral Leishmaniasis in dogs from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil

Variables	Dogs		Univariate Analysis*		Multivariate Analysis**	
	Total	Positive (%)	P	OR (CI95%)	P	OR (CI95%)
<b>Vegetation</b>						
Yes	358	82(86.3)	0.45	1.34		

No	72	13(13.7)		(0.77-2.82)			
<b>Access to the street</b>							
Yes	292	74(77.9)	0.02	1.89			
No	138	21(22.1)		(1.10-3.32)	0.78		
<b>Domestic animals</b>							
Yes	340	78(82.1)	0.49	1.27			
No	90	17(17.9)		(0.75-2.46)			
<b>Trees in the yard</b>							
Yes	194	54(56.8)	0.01	1.83	0.02	1.68	
No	236	41(43.2)		(1.13-2.98)		(1.05-2.69)	
<b>Livestock</b>							
Yes	163	40(42.1)	0.40	1.25			
No	267	55(57.9)		(0.79-1.99)			
<b>LVH neighborhood*</b>							
Yes	47	14(14.7)	0.24	1.58			
No	383	81(85.3)		(0.75-2.90)			
<b>LVC neighborhood *</b>							
Yes	56	22(23.2)	0.002	2.66	0.004	2.43	
No	374	73(76.8)		(1.47-4.75)		(1.33-4.44)	
<b>Vector*</b>							
Yes	21	4(4.2)	0.48	0.82			
No	409	91(95.8)		(0.17-2.07)			
<b>Know Disease*</b>							
Yes	298	75	0.02	1.88			
No	132	20		(1.09-3.24)	0.11		
<b>Insecticide use</b>							
Yes	66	19(20)	0.20	1.53	0.08		
No	364	76(80)		(0.81-2.70)			

---

\*Knowledge reported by pet owner; OR - *Odds Ratio*; \*chi-square with Yate's correction and Fisher's exact test; \*\* logistic regression model

Manuscript Number:

Title: Canine visceral leishmaniasis diagnosis: assessment of PCR in different biological samples

Article Type: Research Paper

Section/Category: Parasitology

Keywords: Visceral leishmaniasis; Dog; Diagnostic molecular; Biological sample; Sectional study

Corresponding Author: Ms Maria de Fatima Madeira, PhD

Corresponding Author's Institution: Fundação Oswaldo Cruz

First Author: Arleana do B.P.F de Almeida, MsC

Order of Authors: Arleana do B.P.F de Almeida, MsC; Valeria R.F Sousa, PhD; Naiami D. Gasparetto; Givago F.R. da Silva; Fabiano B. Figueiredo, PhD; Valeria Dutra, PhD; Luciano Nakazato, PhD; Maria de Fatima Madeira, PhD

Abstract: In diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CanL), the research for more sensitive and specific tools, mainly molecular methods, has been a concern, however there is still no agreement on the best biological sample to be used. The objective of the present study was to evaluate PCR as a tool for diagnosis *Leishmania chagasi* (syn. *Leishmania infantum*) employing samples of buffy coat, bone marrow, intact skin and cutaneous ulcers fragments and lymph node aspirate collected from 430 dogs and correlating the results with the its clinical status. *Leishmania* sp. DNA was detected in 14.6% (n=63) dogs, regardless the sample analyzed. Symptomatic animals presented greater number of positive PCR in lymph node, bone marrow and intact skin samples than asymptomatic animals. The PCR technique proved to be very useful for the detection of *Leishmania chagasi* DNA, mainly in lymph node samples (41; 9.6%), regardless the dog's clinical status. This result and the fact that this sample is easily collected from dogs, lymph nodes aspirates are indicated to be used in epidemiological surveys through PCR. Furthermore, our results shown that cutaneous ulcers, when present, also represent good target to be used in detecting *Leishmania* parasites.

Suggested Reviewers: teresa Cristina Bergamo do Bonfim PhD  
Reserch, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
tcbb@ufrrj.br  
Expertise in area

Reginaldo Peçanha Brazil PhD



Research, Fundação Oswaldo Cruz  
rpbrasil@ioc.fiocruz.br

Rodrigo Caldas Menezes PhD  
Research, Fundação Oswaldo Cruz  
rodrigo.menezes@ipecc.fiocruz.br

1 Canine visceral leishmaniasis diagnosis: assessment of PCR in different biological  
2 samples

3

4 A.B.P.F. Almeida<sup>a,b</sup>, V.R.F. Sousa<sup>b</sup>, N.D. Gasparetto<sup>b</sup>, G.F.R da Silva<sup>b</sup>, F.B.  
5 Figueiredo<sup>c</sup>, V. Dutra<sup>b</sup>, L. Nakazato<sup>b</sup>, M.F. Madeira<sup>d,\*</sup>

6

7 <sup>a</sup> Programa de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de  
8 Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-  
9 900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

10 <sup>b</sup> Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina  
11 Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correa da  
12 Costa 2367, Boa Esperança, 78060-900, Cuiabá, MT, Brazil

13 <sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatозoonoses de Animais Domésticos,  
14 Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil  
15 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

16 <sup>d</sup> Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro  
17 Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ,  
18 Brazil

19

20 \* Corresponding author

21 Maria de Fatima Madeira, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21045-900, RJ, Brazil, Tel.:  
22 +55 21 3865 9541; fax: +55 21 3865 9541, e-mail: [fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br](mailto:fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br)

23

24 ABSTRACT

25 In diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CanL), the research for more sensitive and  
26 specific tools, mainly molecular methods, has been a concern, however there is still no  
27 agreement on the best biological sample to be used. The objective of the present study  
28 was to evaluate PCR as a tool for diagnosis *Leishmania chagasi* (syn. *Leishmania*  
29 *infantum*) employing samples of buffy coat, bone marrow, intact skin and cutaneous  
30 ulcers fragments and lymph node aspirate collected from 430 dogs and correlating the  
31 results with the its clinical status. *Leishmania* sp. DNA was detected in 14.6% (n=63)  
32 dogs, regardless the sample analyzed. Symptomatic animals presented greater number  
33 of positive PCR in lymph node, bone marrow and intact skin samples than  
34 asymptomatic animals. The PCR technique proved to be very useful for the detection of  
35 *Leishmania chagasi* DNA, mainly in lymph node samples (41; 9.6%), regardless the  
36 dog's clinical status. This result and the fact that this sample is easily collected from  
37 dogs, lymph nodes aspirates are indicated to be used in epidemiological surveys through  
38 PCR. Furthermore, our results shown that cutaneous ulcers, when present, also represent  
39 good target to be used in detecting *Leishmania* parasites.

40

41 *Keywords:*

42 Visceral leishmaniasis

43 Dog

44 Diagnostic molecular

45 Biological sample

46 Sectional study

47

48

## 49 **1. Introduction**

50 Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis with high prevalence in Latin American  
51 countries (WHO, 2012). In the transmission cycle, the domestic dog is considered an  
52 important reservoir and regardless the clinical manifestation, it is a source of infection  
53 for Phlebotominae vectors (Ministério da Saúde, 2006).

54 In Brazil, VL occurs in urban and periurban areas and requires compulsory  
55 notification. One of the control measures recommended is the euthanasia of dogs  
56 seroreactive to *Leishmania* sp. (Ministério da Saúde, 2006). For this reason, it is very  
57 important that the tests used for Leishmaniasis diagnosis are accurate, with high  
58 sensitivity and specificity. Recently, a fast immunochromatographic test, Dual path  
59 platform (DPP) began to be used in Brazil as screening test in routinely dog diagnosis  
60 (Ministério da Saúde, 2011). However, the confirmation of the infection through  
61 parasite and / or DNA detection becomes important, mainly in areas of overlapping of  
62 different agents (Silva et al., 2011) or areas where the disease has recently installed  
63 (Souza et al., 2009). Biological samples such as blood, aspirates and tissue fragments  
64 from different organs can be used for parasitological research of *Leishmania* sp.,  
65 however there is still no agreement on which should be the standard sample.  
66 Nevertheless, the simplicity of collecting it, with less invasiveness and the laboratory  
67 method used must be considered (Saridomichelakis, 2009). We cannot fail to mention  
68 that aspects such as sensitivity and specificity of the diagnostic test may vary as a  
69 function of the clinical sample analyzed and the dog's clinical status (Martinez et al.,  
70 2011). In this context, PCR appeared as an alternative, because it represents a gain in  
71 diagnosis sensitivity and specificity, and is very useful, mainly in those cases not  
72 resolved by the direct or indirect classical methods (Lachaud et al., 2002; Gomes et al.,  
73 2007; Moreira et al., 2007).

74 The aim of the present study was to evaluate PCR as a diagnosis tool for  
75 *Leishmania chagasi* using different biological samples collected from domestic dogs  
76 from CanL endemic areas

77

## 78 **2. Materials and methods**

### 79 *2.1. Animals and Biological Samples*

80 The animals evaluated in the present study were from a transversal study  
81 conducted in Cuiabá city (MT) located in the Mid-Western region of Brazil, involving  
82 430 dogs (Almeida et al., 2011). The dogs were clinically examined and grouped into  
83 symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic according to Mancianti et al. (1988).

84 After obtaining informed consent from the owners, the dogs were mechanically  
85 contained and subjected to sedation with ketamine (10mg/kg) associated with  
86 acepromazine (0.2mg/kg). Samples of blood, bone marrow, lymph nodes aspirates and  
87 tissue fragments (intact skin and cutaneous ulcers) were collected from all the animals  
88 for PCR. Around 5 mL of blood were collected from each animal by cephalic or jugular  
89 venipuncture and the buffy coat separated by centrifugation and the bone marrow  
90 (0.5mL) through aspiration from the manubrium of the sternum and, both with  
91 anticoagulants. The ganglionar aspirates were obtained from popliteal lymph nodes,  
92 with Valeri cytoaspirator and placed in microtubes containing 250ul of sterile saline  
93 solution. The tissue biopsies were collected after local anesthesia with 2% lidocaine and  
94 the fragments were also placed in sterile microtubes. All the biological samples were  
95 kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the use.

96 All the procedures conducted with the animals were approved by the Ethics  
97 Committee on Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation  
98 (CEUA/FIOCRUZ/52/2009-3, protocol LW-01/10).

99 2.2. *DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction*

100 The extraction of DNA from the samples was performed according to Gomes et  
101 al. (2007). Briefly, the samples collected by puncture (buffy coat, bone marrow and  
102 lymph node) and the tissue fragments (intact skin and cutaneous ulcers) were dissolved  
103 in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01%  
104 *N*-laurilsarcosinate and 100 µg/ml of proteinase K. Then, they were strongly shaken in  
105 vortex and incubated at 56°C for 12-18 hours. DNA extraction was performed by the  
106 phenol/chloroform/isoamyl alcohol method and precipitated by isopropanol. After  
107 washing with 70% ethanol for 10 minutes at 10,000 x g, the DNA precipitate was  
108 dissolved in ultra-pure water containing 20µg/ml of RNase and stored at -20°C until the  
109 moment of the PCR assays.

110 Initially we used the 150 (sense) primers 5'-  
111 GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3' and 152 (antisense) 5'  
112 (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' that amplify a product of  
113 120pb of a variable region of the kDNA minicircle of the *Leishmania* genus (Degraeve et  
114 al., 1994). For the reaction 200µM of dNTP, 1µM of each primer, (10mM Tris-HCl,  
115 50mM KCl, pH 8,3) buffer solution, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5U of Taq DNA polymerase and  
116 2µl of sample DNA were used in a final volume 20µl. PCR conditions were: initial  
117 denaturation at 94°C for 4 minutes, followed by 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C  
118 for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes.

119 A second PCR assay was carried out in the samples where there was amplification  
120 of *Leishmania* sp. DNA. This time the primers RV1- 5'-CTT TTC TGG TCC CGC  
121 GGG TAG G-3' e RV2 - 5'-CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3' that amplify a  
122 sequence of 145pb, specific of *Leishmania chagasi* were used (Lachaud et al. 2002).  
123 The time and temperature amplification conditions were: initial denaturation at 94°C for

124 4 minutes, followed by 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for  
125 30 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes. In all the tests, reference  
126 samples of *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)  
127 and *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) were used in both PCR assays.

128 The product from amplification was fractionated by 2% agarose gel  
129 electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized in a transilluminator (UV-  
130 300nm).

131

### 132 2.3. Result Analysis

133 The results obtained were transferred to a database and statistically analyzed by  
134 EpiInfo 3.3.2 (CDC, Atlanta, EUA) program. Differences in the frequencies of positive  
135 results for each clinical sample, comparative analyses of PCR results among different  
136 clinical samples, and comparisons between clinical groups were performed using the  
137 chi-square test. In order to evaluate the index of agreement between PCR and  
138 parasitological culture (Almeida et al., 2011), Kappa measurement (k) was used  
139 according to classification proposed by Shrout (1998).

140

## 141 3. Results

142 From 430 evaluated dogs, samples of buffy coat and intact skin fragments were  
143 collected from 100% animals, while samples of bone marrow and lymph nodes aspirate  
144 were obtained from 429 (99.8%) and 427 (99.3%) animals, respectively. Twenty-two  
145 (5.1%) dogs presented cutaneous ulcers, located in the ear (14), back limbs (3), scrotum  
146 (2), nostrils (2), and upper lip (1).

147 Clinically, 42 (9.8%) dogs were symptomatic, presented clinical signs such as  
148 severe weight loss, generalized lymphadenomegaly, splenomegaly, onychogryphosis,

149 dermatologic and ophthalmic disorders, while 150 (34.9%) were oligosymptomatic with  
150 weight loss, lymphadenomegaly and localized alopecia as the most frequent clinical  
151 signs, and 238 (55.3%) animals were considered asymptomatic.

152 *Leishmania* sp. DNA was detected in 63 (14.6%) dogs, regardless the sample  
153 analyzed and *L. chagasi* DNA was confirmed in all the samples when a specific primer  
154 was used. From those animals, 13 (30.9%) were symptomatic, 23 (15.3%)  
155 oligosymptomatic and 27 (11.3%) asymptomatic for CanL.

156 PCR was positive in two or more samples in 17 (27%) dogs, in two samples in 20  
157 (31.7%) and in just one sample in 26 (41.3%). In cases where the PCR was positive in  
158 only one site, the buffy coat were positive in 9 animals, skin and lymph node in 7, bone  
159 marrow in two and skin ulcer in 1 dog.

160 The lymph node (41; 9.6%) was the sample that presented higher number of  
161 positive results, followed by the intact skin (27; 6.3%), bone marrow (26; 6.1%) and  
162 buffy coat (20; 4.6%). *Leishmania* DNA was detected in 13 (59.1%) out of 22  
163 cutaneous ulcers fragments collected from dogs (Table 1).

164 PCR proved to be statistically better for *Leishmania* DNA detection in  
165 symptomatic animals when compared to oligosymptomatic ( $p < 0.001$ ) and asymptomatic  
166 ( $p < 0.001$ ), with a likelihood 4.85 (2.17-11.03) and 10.43 (4.7-23.53) times greater,  
167 respectively. The likelihood of *Leishmania* sp. DNA detection in oligosymptomatic  
168 dogs was 2.15 (1.31-3.52) times greater than in asymptomatic ( $p = 0.001$ ). However,  
169 when each sample was evaluated separately, the samples of intact skin, bone marrow  
170 and lymph node were statistically better for the detection of the agent in symptomatic  
171 animals when compared to asymptomatic ( $p = 0.02$ ; 0.01 and 0.007, respectively).  
172 Although the buffy coat was the sample with higher number of positive results in



173 asymptomatic dogs, this sample was not statistically better in any clinical group  
174 ( $p>0.05$ ).

175         When we compare PCR results in the different clinical samples, we observe that  
176 there was no statistical difference between asymptomatic and symptomatic dogs.  
177 However the lymph node was statistically better for *Leishmania* DNA detection when  
178 compared to buffy coat ( $p=0.04$ ; OR 2.91[1.03-8.6]) in oligosymptomatic dogs.

179         From 430 dogs evaluated, in 12 (22.1%) was isolated *Leishmania chagasi* in  
180 parasitological culture (Almeida et al., 2011), and all were positive in PCR. Such tests  
181 presented a low agreement ( $k$  0.287 [0.155-0.418])

182

#### 183 **4. Discussion**

184         The importance of the dog in VL transmission cycle is widely recognized  
185 (Ministério da Saúde, 2006; Marzochi et al., 2009), concentrating efforts in research  
186 diagnostic methods that can discriminate infected dogs (Fisa et al., 2001; Gomes et al.,  
187 2007; Moreira et al., 2007; Coura-Vital et al., 2011; Grimaldi Jr et al., 2012; Teles et al.,  
188 2012). In the present study, we confirmed by PCR the *Leishmania* infection in 14.6%  
189 ( $n=63$ ) dogs in Cuiabá, where previously *L. chagasi* had been isolated and identified in  
190 dogs of the same area (Almeida et al., 2011).

191         Although little used in epidemiological surveys, the molecular techniques have  
192 shown higher prevalence than obtained by serological methods (Coura-Vital et al.,  
193 2011). According to Oliva et al. (2006) this can be related to the sensitivity of PCR in  
194 detecting infection even before the occurrence of seroconversion. In Cuiabá city, the  
195 serological prevalence for CanL has varied from 3.4 to 22.1%, depending on the area  
196 investigated (Almeida et al., 2009; Almeida et al., 2012). Another aspect related to the  
197 use of serological tests only for diagnosis *Leishmania* infection in dogs, is the

198 possibility of cross reactions in serological tests, mainly in areas of overlapping with  
199 other trypanosomatids (Vexenat et al., 1996; Alves et al., 2012). In this context,  
200 *Trypanosoma caninum*, a species recently described in Rio de Janeiro municipality  
201 (Madeira et al., 2009a) was found in 14 out of the 430 studied dogs (Almeida et al.,  
202 2011; Barros et al., 2012), reinforcing the importance of using more accurate diagnostic  
203 methods.

204 The parasite isolation in culture is considered the gold standard in the diagnosis of  
205 infection by *Leishmania* sp. This study found poor agreement between culture and PCR.  
206 However, the detection of DNA in all dogs with parasite isolation demonstrates  
207 reliability in the use of PCR as a diagnostic tool in CanL diagnosis. Variations in the  
208 results obtained in PCR may occur depending on the primers used and the target DNA  
209 amplified (Bastien et al., 2008). In our study we used kinetoplastid DNA sequences that  
210 present large number of copies of the parasite, thus increasing the sensitivity of the test  
211 (Lachaud et al., 2002; Solcá et al., 2012). Despite these possible variations, the PCR  
212 does not produce false positives (Teles et al., 2012).

213 PCR has proven to be an efficient technique for detecting infection by  
214 *Leishmania*, however doubts on the better biological sample to be used encouraged  
215 many researches (Fisa et al., 2001; Manna et al., 2004; Lombardo et al., 2012; Teles et  
216 al., 2012). Most of the doubts refer to the invasive collection of the biological sample,  
217 considering also, in this context, the lymph node and bone marrow samples, which  
218 impairs its application in epidemiological surveys (Fisa et al., 2001; Manna et al., 2004;  
219 Lombardo et al., 2012). Although those samples present high sensitivity and specificity,  
220 these authors point the way to obtain such samples negative. Intact skin has also proven  
221 to be an excellent target for CanL diagnosis, mainly through culture (Madeira et al.,  
222 2009; Almeida et al., 2011). Cutaneous ulcers showed good results in the detection of

223 *Leishmania chagasi* DNA. Furthermore, cutaneous ulcer is the site of predilection of *L.*  
224 *braziliensis* (Madeira et al., 2009), which makes their use important in characterizing  
225 the agent involved in canine infection particularly in overlapping areas of tegumentary  
226 and visceral leishmaniasis.

227 In CanL the parasites can be eliminated resulting in self-limiting infection or may  
228 lodge at some sites of the animal organism, causing generalized infection, symptomatic  
229 or asymptomatic, depending on animal susceptibility and duration of infection  
230 (Saridomichelakis, 2009). In this sense, the biological sample used as well as the  
231 diagnostic technique and the animal's clinical status must be considered. In our study,  
232 the likelihood of detecting *Leishmania chagasi* DNA was superior in animals  
233 systemically compromised when compared to those that presented slight signals or  
234 without clinical signs of infection. This result is consistent with reports from other  
235 studies, showing that the clinical seriousness of the dogs helps the diagnosis, regardless  
236 the technique being used (Martinez et al., 2011).

237 The asymptomatic CanL cases present more obstacles for an accurate diagnosis,  
238 mainly because they constitute the clinical group with higher prevalence in VL endemic  
239 areas (Marzochi et al., 2009), an aspect that was also observed in the present study. The  
240 diagnosis of symptomatic cases was easier when compared to asymptomatic dogs when  
241 using lymph node, bone marrow and skin samples. Despite the dogs asymptomatics  
242 presented higher number of positive results in the buffy coat sample, this result was not  
243 significant, although this same sample had shown good results in clinically healthy dogs  
244 in other studies (Coura-Vital et al., 2011).

245 The popliteal lymph node aspirate presented a higher number of positive results  
246 for *L. chagasi* detection when compared to the other samples analyzed. According to  
247 Maia et al. (2009) the lymph nodes, together with the spleen are the preferred internal

248 tissues for *L. chagasi* multiplication. Saridomichelakis (2009) also describes that the  
249 lymph nodes, together with the skin, are the first sites to be in contact with the infection  
250 agent. Thus, the parasitemia in those organs, can be constant in all the clinical phases of  
251 the infected dog, explaining the better performance of this samples in CanL diagnosis,  
252 regardless the clinical manifestations, as also described by Teles et al. (2012).

253 In summary, the lymph node aspirate presented the best results for *L. chagasi*  
254 DNA detection, regardless the clinical status of the dog. In addition, this sample is  
255 easily collected, thus, it can be used in epidemiological surveys. Furthermore, our  
256 results shown that cutaneous ulcers, when present, also represent good target to be used  
257 in detecting *Leishmania* parasites.

258

## 259 **Acknowledgements**

260 This work was supported, in part, by grants from the Fundação de Amparo a  
261 Pesquisa do estado de Mato Grosso (FAPEMAT), CNPq (process n° 474894/2010-0)  
262 and Fundação de Amparo a Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, E-  
263 26/103.223/2011).

264

## 265 **References**

266 Almeida, A.B.P.F., Faria, R.P., Pimentel, M.F.A., Dahroug, M.A.A., Turbino,  
267 N.C.M.R., Sousa, V.R.F., 2009. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose  
268 canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. Revista da  
269 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42, 156-159.

270 Almeida, A.B.F., Sousa, V.R., Boa Sorte, E.C., Figueiredo, F.B., Paula, D.A  
271 J., Pimentel, M.F., Dutra, V., Madeira, M.F., 2011. Use of parasitological culture to

272 detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. Vector-Borne  
273 and Zoonotic Disease 11, 1555-1560.

274 Almeida, A.B.F., Sousa, V.R., Cruz, F.A.C.S., Dahroug, M.A.A, Figueiredo, F.B.,  
275 Madeira, M.F., 2012. Canine Visceral Leishmaniasis: Seroprevalence and risk  
276 factors in Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia  
277 Veterinária. *In press*

278 Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A.O.,  
279 Madeira, M.F., 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine  
280 visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Research in  
281 Veterinary Science 93, 1329-1333.

282 Barros, J.H.S., Almeida, A.B., Figueiredo, F.B., Sousa, V.R., Fagundes, A., Pinto,  
283 A.G., Baptista, C., Madeira, M.F., 2012. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in  
284 areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine  
285 leishmaniasis control? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and  
286 Hygiene 106, 419-423.

287 Bastien, P., Procop, G.W., Reischl, U., 2008. Quantitative real-time PCR is not more  
288 sensitive than “conventional” PCR. Journal of Clinical Microbiology, 46, 1897-  
289 1900.

290 Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D.O,  
291 Reis, L.E.S., Braga, S.L., Morais, M.H.F., Reis, A.B., Carneiro, M., 2011.  
292 Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from  
293 an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Neglected  
294 Tropical Diseases 5, e1291.

295 Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.G., 1994. Use of  
296 molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review.  
297 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89, 463-469.

298 Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., Portus, M., 2001. Nested PCR for  
299 diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone  
300 marrow aspirates. Veterinary Parasitology 99, 105-111.

301 Gomes, A.H.S., Ferreira, I.M.R., Lima, M.L.S.R., Cunha, E.A., Garcia, A.S., Araújo,  
302 M.F.L., Pereira-Chioccola, V.L., 2007. PCR identification of *Leishmania* in  
303 diagnosis and control of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology 144, 234-  
304 241.

305 Grimaldi Jr, G., Teva, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.B., Pinto, I.S., de-Azevedo,  
306 C.T., Falqueto, A., 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay  
307 based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the  
308 serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of  
309 Tropical Medicine and Hygiene 106, 54-59.

310 Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien,  
311 P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection on  
312 canine visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology 40, 210-215.

313 Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Caprì, A., Solano-Gallego, L.  
314 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and  
315 conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Veterinary  
316 Parasitology 184, 10-17.

317 Madeira, MF, Figueiredo, FB, Pinto, AG, Nascimento, LD, Furtado, M., Mouta-  
318 Confort, E., de Paula, C.C., Bogio, A., Gomes, M.C.A., Bessa, A.M.S., Passos,

319 S.R.L., 2009. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact  
320 skin a good target? *Research in Veterinary Science* 87, 260-262.

321 Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H.S., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach,  
322 A., de Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K. Marzochi, M.C.A.,  
323 2009a. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from  
324 intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil.  
325 *Parasitology* 136, 401-413.

326 Maia, C., Ramada, J., Cristovão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of  
327 canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different  
328 tissues. *The Veterinary Journal* 179, 142-144.

329 Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine  
330 leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine  
331 leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of*  
332 *Tropical Medicine and Hygiene* 82, 566-567.

333 Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Della Morte, R., Cringoli,  
334 G., Staiano, N., Gravino, A. E., 2004. Comparison of different tissue sampling for  
335 PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary*  
336 *Parasitology* 125, 251-262

337 Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011. Canine  
338 leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors* 4,  
339 57.

340 Marzochi, M.C., Fagundes, A., Andrade, M.V., Souza, M.B., Madeira, M.F., Mouta-  
341 Confort, E., Schubach, A.O., Marzochi, K.B., 2009. Visceral leishmaniasis in Rio  
342 de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Revista da Sociedade*  
343 *Brasileira de Medicina Tropical* 42, 570-580.

344 Ministério da Saúde, 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.  
345 Brasília-DF. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, 120pp.

346 Ministério da Saúde, 2011. Nota técnica conjunta nº 01/2011 – CGDT/DEVIT/SUS/MS.  
347 Esclarecimento sobre a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose  
348 visceral canina (LVC). Brasília-DF, Brasil.

349 Moreira, M.A.B., Luvizotto, M.C.R., Garcia, J.F., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D.,  
350 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the  
351 diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary*  
352 *Parasitology* 145, 245-252.

353 Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V.F., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T.,  
354 Gradoni L. 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections  
355 examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of  
356 naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical*  
357 *Microbiology* 44, 1318-1322.

358 Saridomichelakis, M.N., 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis:  
359 epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology* 20, 471-489.

360 Shrout, P.E., 1998. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Statistical*  
361 *Methods in Medical Research* 7, 301-317.

362 Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., Souza, C.M., Figueiredo, F.B., 2011.  
363 Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the  
364 leishmaniasis control program. *Veterinary Parasitology* 179, 257-261.

365 Solcà, M.S., Guedes, C.E.S., Nascimento, E.G., Oliveira, G.G.S., Santos, W.L.C.,  
366 Fraga, D.B.M., Veras, P.S.T., 2012. Qualitative and quantitative polymerase chain  
367 reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally  
368 infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 184, 133-140.



369 Souza, G.D., Santos, E., Andrade Filho, J.D., 2009. The first report of the main vector  
370 of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)  
371 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.  
372 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 1181-1182.

373 Teles, N.M.M, Agostini, M.A.P., Bigeli, J.G., Noletto, R.V., Oliveira, J.D., Oliveira  
374 Junior, W.P., 2012. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in  
375 dogs caught in Palmas, TO, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,  
376 21, 278-282.

377 Vexenat, A.C., Santana, J.M., Teixeira, A.R., 1996. Cross-reactivity of antibodies in  
378 human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*  
379 *chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Revista do Instituto de Medicina  
380 Tropical de São Paulo 38, 177-185.

381 World Health Organization (WHO), 2012. Disease Watch Focus: Leishmaniasis.  
382 [http://www.who.int/tdr/publications/disease watch/leish/en/index.html](http://www.who.int/tdr/publications/disease%20watch/leish/en/index.html).

383

Table 1: Parasitological culture and PCR results of the investigation of *Leishmania chagasi* DNA, in different biological samples obtained from 430 dogs

Clinical status	Positive culture#	PCR					Total +/n
		Blood	Lympho node	Bone marrow	Skin	Cutaneous ulcers	
Asymptomatics (n=238)	04	11	15	09	10	01	27/238
Oligosymptomatic (n=150)	04	06	16	11	11	07	23/150
Symptomatic (n=42)	04	03	10	06	06	05	13/42
Total +/n	12/430 (2.8%)	20/430 (4.6%)	41/427 (9.6%)	26/429 (6.1%)	27/430 (6.3%)	13/22 (59.1%)	63/430 (14.6%)

# data published by Almeida et al. (2011)

Manuscript Number:

Title: Natural infection by Trypanosoma caninum, a new parasite isolated from dogs: study of 14 cases occurred in Cuiabá, Brazil

Article Type: Research Paper

Keywords: Dog; Leishmania chagasi; Co-infecção; Diagnostic

Corresponding Author: Mrs Maria de Fatima Madeira, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Fundação Oswaldo Cruz

First Author: Maria de Fatima Madeira, Ph.D

Order of Authors: Maria de Fatima Madeira, Ph.D; Arleana do B.F. de Alemeida, MSc; Juliana H. da S. Barros, MSc; Valeria Regia Franco Sousa, Ph.D; Andreia S. Alves, MSc; Luciana de F.C. Miranda, MSc; Tatiana da S. F. de Oliveira, MSc; Armando de O. Schubach, Ph.D; Mauro Celio de A. Marzochi, Ph.D

Abstract: Trypanosoma caninum constitutes the most recent trypanosomatid specie described in Brazil which infects domestic dogs. In this study clinical and laboratory aspects of 14 dogs naturally infected by this parasite, which were diagnosed during a cross-sectional study on Leishmaniasis in Cuiabá (Mato Grosso, Brazil), are described. The animals were assessed at interval of 3, 6 and 12 months and the presence of the parasite and/or DNA in different biological samples have been investigated by parasitological (culture and smears exams) and molecular (DNA-based tests) methods. Specific anti-T. caninum and anti-Leishmania antibodies were also investigated. In the 14 animals studied, 10 have shown a good general state and anti-T. caninum IgG antibodies were confirmed by IFAT and ELISA in 10 and 8 animals, respectively. During the monitoring, the clinical status of the animals did not vary. Two co-infection cases by Leishmania were found and relevant clinical signs were found in one case only, due to CanL. Although intact skin, cutaneous scar, blood, bone marrow and lymph node aspirate samples were analyzed in the different intervals, T. caninum was found only in the intact skin, confirming a particular biological characteristic of this parasite, previously appointed. The results showed in this study suggest that T. caninum is not pathogenic and/or little virulent to the dogs and the infection course is asymptomatic and transitory with low humoral immune response. Additionally, this study confirm the overlapping endemic areas for T. caninum and L. chagasi in Cuiabá and broaden of the knowledge of this new parasite described in Brazil, which may be useful in control actions that involving the visceral leishmaniasis.



October 20<sup>th</sup>, 2012

Dear Editor

We are sending the paper untitled: "**Natural infection by *Trypanosoma caninum*, a new parasite isolated from dogs: study of 14 cases occurred in Cuiabá, Brazil**" to be peer reviewed and published in the *Veterinary Parasitology*.

This paper is being submitted in the original format and describes aspects of the protozoon *T. caninum*. This parasite was recently described by our group infecting domestic dogs in Brazil and this finding has been caused some concern because the dog is the urban reservoir of *L. chagasi*, agent of visceral leishmaniasis. Apparently this parasite shows low pathogenicity for dogs, however little is known about this agent. During a cross-sectional study on leishmaniasis we detected 14 dogs naturally infected by this parasite, enabling the study of this trypanosomatid under certain aspects.

The results are interesting and reinforce previous reports already obtained in other studies. We believe that the disclosure of these results will be important, particularly about the possibility of this phenomenon interfere in the control of visceral leishmaniasis in Brazil.

The authors provide assurance the project underwent ethical review and was given approve by the Ethics Committee on Animal Research of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA/FIOCRUZ)

We hereby declare that all data contained are accurate, all authors have participated in the work in a substantive way and are in agreement with its content. The manuscript being submitted to this Journal has not been published and is not being submitted for publication elsewhere.

Thanks a lot,

Maria de Fatima Madeira

Adress: Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Laboratório de de Vigilância em Leishmaniose, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21045-900, RJ, Brazil

e-mail adress: fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br

1 Natural infection by *Trypanosoma caninum*, a new parasite isolated from dogs: study of  
2 14 cases occurred in Cuiabá, Brazil

3

4 Maria de Fatima Madeira<sup>a,\*</sup>, Arleana do B.P.F. de Almeida<sup>b</sup>, Juliana H.S. Barros<sup>a</sup>,  
5 Valéria R.F. Sousa<sup>b</sup>, Andreia S. Alves<sup>a</sup>, Luciana de F.C. Miranda<sup>a</sup>, Tatiana da S.F. de  
6 Oliveira<sup>a</sup>, Armando de O. Schubach<sup>a</sup>, Mauro Célio de A. Marzochi<sup>a</sup>

7

8 <sup>a</sup> Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
9 (IPEC), Laboratório de Vigilância em Leishmaniose, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro  
10 21045-900, RJ, Brazil

11 <sup>b</sup> Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Departamento de Clínica Médica  
12 Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Fernando  
13 Correa da Costa S/N, Boa Esperança, Cuiabá, 78060-900, MT, Brazil

14

15

16 \* Corresponding author

17 Maria de Fatima Madeira, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21045-900, RJ, Brazil, Tel.:  
18 +55 21 3865 9541; fax: +55 21 3865 9541, e-mail: [fatima.madeira@ipec.fiocruz.br](mailto:fatima.madeira@ipec.fiocruz.br)

19

20

21 **Abstract**

22 *Trypanosoma caninum* constitutes the most recent trypanosomatid specie described in  
23 Brazil which infects domestic dogs. In this study clinical and laboratory aspects of 14  
24 dogs naturally infected by this parasite, which were diagnosed during a cross-sectional  
25 study on Leishmaniasis in Cuiabá (Mato Grosso, Brazil), are described. The animals  
26 were assessed at interval of 3, 6 and 12 months and the presence of the parasite and/or  
27 DNA in different biological samples have been investigated by parasitological (culture  
28 and smears exams) and molecular (DNA-based tests) methods. Specific anti-*T. caninum*  
29 and anti-*Leishmania* antibodies were also investigated. In the 14 animals studied, 10  
30 have shown a good general state and anti-*T. caninum* IgG antibodies were confirmed by  
31 IFAT and ELISA in 10 and 8 animals, respectively. During the monitoring, the clinical  
32 status of the animals did not vary. Two co-infection cases by *Leishmania* were found  
33 and relevant clinical signs were found in one case only, due to CanL. Although intact  
34 skin, cutaneous scar, blood, bone marrow and lymph node aspirate samples were  
35 analyzed in the different intervals, *T. caninum* was found only in the intact skin,  
36 confirming a particular biological characteristic of this parasite, previously appointed.  
37 The results showed in this study suggest that *T. caninum* is not pathogenic and/or little  
38 virulent to the dogs and the infection course is asymptomatic and transitory with low  
39 humoral immune response. Additionally, this study confirm the overlapping endemic  
40 areas for *T. caninum* and *L. chagasi* in Cuiabá and broaden of the knowledge of this  
41 new parasite described in Brazil, which may be useful in control actions that involving  
42 the visceral leishmaniasis.

43

44 **Keywords:** Dog, *Leishmania chagasi*, Co-infecção, Diagnostic

45

## 46 **1. Introduction**

47 *Trypanosoma caninum* is a parasite firstly described in Rio de Janeiro state (Madeira  
48 et al., 2009; Pinto et al., 2010) and later in other states in Brazil (Barros et al., 2012).  
49 Although it is a recently recognized species, 53 cases of the natural infection in dogs  
50 have already been registered in areas where canine visceral leishmaniasis (CanL) is  
51 endemic. Aspects related to the pathogenesis of this parasite for dogs or the possible  
52 involvement of other vertebrate and/or invertebrate hosts in the transmission cycle are  
53 still unknown. Information collected so far show that *T. caninum* is a species with  
54 particular biological characteristics, being isolated exclusively from intact skin  
55 fragments, unusual feature for *Trypanosoma* genus representatives; it does not infect  
56 triatomine insects and grows very well in axenic cultures, with predominance of  
57 epimastigote forms (Madeira et al., 2009). Molecular analysis of partial SSU ribosomal  
58 DNA sequences have shown that all isolated from *T. caninum* described so far are  
59 genetically identical or closely similar (Barros et al., 2012). Apparently, this parasite  
60 seems to be little immunogenic for dogs, even though it is able to stimulate the  
61 production of specific antibodies (Alves et al., 2012).

62 In Brazil, visceral leishmaniasis (VL) is endemic in many regions and the dog is the  
63 main domestic reservoir, playing an important role in the epidemiological cycle, thus  
64 constituting one targets in the control actions (Ministério da Saúde, 2006). The  
65 phenomenon of *T. caninum* to parasitize domestic dogs in overlapping areas with VL is  
66 a theme currently in evidence, mainly for the possible interference in the VL control  
67 actions that are carried out in Brazil

68 The finding of 14 dogs naturally infected by *T. caninum* (Almeida et al., 2011)  
69 during a cross-sectional study on Leishmaniasis done in Cuiabá city, Mato Grosso state,



70 located in the Midwest of Brazil, enabled the study of aspects related to the natural  
71 infection by this parasite.

72

## 73 **2. Materials and methods**

### 74 *2.1 Animals and collection of biological samples*

75 Fourteen dogs naturally infected by *T. caninum* were studied. The animals were  
76 identified during the cross-sectional survey for CanL done in Cuiabá city, Mato Grosso,  
77 in 2009 (Almeida et al., 2011). The diagnosis of the infection has been established by  
78 parasitic isolation and posterior identification by PCR (18S rDNA) and sequencing  
79 (Barros et al., 2012). In this occasion the animals were submitted to sedation with  
80 Ketamine (10 mg/Kg) associated with Acepromazine (0.2 mg/Kg) for the physical  
81 examination and collection of biological samples following Ethics Committee on the  
82 Use of Animals, approved by Oswaldo Cruz Foundation (CEUA license number LW-  
83 01/10). The physical examination has been directed to clinical signs compatible with  
84 CanL (e.g weight loss, lymphadenopathy, conjunctivitis, alopecia, splenomegaly and  
85 presence of ulcers or cutaneous scars). After the physical examination, the collection of  
86 the following biological samples was done:

87 a) Blood: it was obtained from the jugular vein (~10 mL) with scalp and put into two  
88 tubes, one for obtaining serum used in serological tests and the other one containing  
89 anticoagulant (EDTA) for culture and molecular assays. At this moment, part this  
90 material was smeared onto slides for the cytological exam.

91 b) Bone marrow: about 0.5-1.0 mL has been collected from the sternum and put into a  
92 tube containing anticoagulant (EDTA) and processed as the blood described  
93 previously. Slides with bone marrow smears have also been done.

94 c) Lymph node: this material has been obtained by the puncture of the most enlarged  
95 popliteal lymph node with the use of Valery aspirator. From the punctured material  
96 (about 0.1-0.3 mL), 2 slides with smears were done and part was reserved for  
97 molecular analysis.

98 d) Intact skin and cutaneous scar: intact skin fragments have been collected from the  
99 scapular region with a 3-mm punch after trichotomy, antisepsis and local anaesthesia  
100 with lidocaine 2%. Two fragments have been put in physiological solution for culture  
101 and a fragment has been stored at -20°C for molecular tests. Cutaneous scar  
102 fragments have been processed the same way of the skin.

103 The monitoring of the animals was done 3, 6 and 12 months after the initial  
104 diagnosis, in order to evaluate the clinical course of the infection by *T. caninum* and  
105 research its presence and/or DNA in biological samples collected in these intervals by  
106 parasitological and molecular tools.

107

## 108 2.2. Laboratory investigations

### 109 2.2.1 Serological tests

110 Anti-*T. caninum* and anti-*Leishmania* sp. IgG antibodies were assessed in serum of  
111 all animals by indirect fluorescence antibody test (IFAT), immunoenzymatic assay  
112 (ELISA) and immunochromatographic test DPP® (Dual Path Platform).

113 Anti-*T. caninum* IgG antibodies have been researched using in house tests (IFAT  
114 and ELISA) with homologue antigens following protocols according to Alves et al.,  
115 (2012). For the tests to detect anti-*Leishmania* IgG antibodies, IFAT (IFI-leishmaniose  
116 visceral canina), ELISA (EIE-leishmaniose visceral canina) and the  
117 immunochromatographic rapid test (DPP®) kits have been used. These commercial  
118 tests are manufactured by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ/MS and distributed to public

119 service for CanL diagnosis in Brazil (Ministério da Saúde, 2006; Grimaldi et al., 2012).  
120 The procedure with the kits followed the manufacturer's instructions.

121

### 122 *2.2.2 Parasitological diagnosis: culture procedure and smear examinations*

123 For culture, intact skin and scar fragments, blood and bone marrow have been  
124 processed. Tissue fragments were initially immersed in saline solutions containing  
125 1,000U penicillin, 200 µg streptomycin, and 50 µg 5' fluorocytosine per milliliter, and  
126 stored at 4°C for 24 h. Thereafter, each fragment was seeded into screw cap tubes  
127 containing blood-agar slants (NNN - Novy, MacNeal and Nicolle) overlaid with 1.5 ml  
128 of Schneider's *Drosophila* Medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum  
129 (FCS). The blood and bone marrow (~0.2-0.3 mL) were seeded immediately after the  
130 collection in tubes containing the same culture medium. All cultures were duplicated,  
131 processed and kept at 27°C ( $\pm 0.4^\circ\text{C}$ ) and weekly examined under optical microscopy  
132 for 40-50 days. The isolated parasites were identified by isoenzyme electrophoresis  
133 technique (promastigote forms) or by PCR assay (epimastigote forms) as described by  
134 Almeida et al., (2011) and Barros et al., (2012), respectively.

135 The smears of blood, bone marrow and lymph node aspirates were fixed in methyl  
136 alcohol and later stained by Giemsa. The slides were examined through optical  
137 microscopy scanning at least 2,000 microscopic fields (x1000) looking for the presence  
138 of any parasite.

139

### 140 *2.2.3 Molecular assays*

141 The blood, bone marrow and tissue (intact skin and scar fragments) samples have  
142 been processed for three different PCR assays. Initially, the DNA of all samples was

143 extracted in accordance with phenol-chloroform method (Gomes et al., 2007). After this  
144 procedure, the DNA were stored in a freezer at -20°C until PCR assays.

145 a) DNA detection with targets directed to 18S region (rDNA): the nested-PCR  
146 protocol described by Smith et al., (2008) has been used, and the same test has been  
147 used to identify *T. caninum* isolates (Barros et al., 2012). External primers TRY927F  
148 (5' GAAACAAGAAACACGGGAG 3') and TRY927R (5'  
149 CTACTGGGCAGCTTGGA 3') have been used applied for the first round and internal  
150 primers SSU561F (5' TGGGATAACAAAGGAGCA 3') and SSU561R (5'  
151 CTGAGACTGTAACCTCAAAGC 3') for the second round. Each PCR run included  
152 positive controls as *Trypanosoma caninum* DNA (MCAN/BR/2003/A27) and  
153 *Leishmania chagasi* DNA (MHOM/BR/1974/PP75).

154 b) DNA detection with targets directed to kDNA-minicircle: protocols described by  
155 Degraeve et al., (1994) have been used with primers: 5'- (G/C) (G/C) (C/G)  
156 CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC- 3' and 5'- GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA -  
157 3'. As positive control, *Leishmania chagasi* DNA (MHOM/BR/1974/PP75) has been  
158 used.

159 c) DNA detection of constitutive gene ( $\beta$ -globin): this assay was used as internal  
160 control of PCR reactions, in order to confirm the absence of the inhibition factors. The  
161 primers 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' and 5' ACA CAA CTG TGT TCA  
162 CTA GC 3' were used, which amplify a product of 118bp, following the protocol  
163 according to Quaresma et al., (2009).

164 All PCR products were run on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide,  
165 and visualized under UV light.

166

167

168 **3. Results**

169 *3.1 Animals*

170 Among 420 dogs examined in the serological survey for CanL, 14 (3.25%) infected  
171 by *T. caninum* were included in this study. Among these 14 dogs, 11 were male, 12 had  
172 non-defined breed and the age ranged between 8 months and 8 years (median = 2  
173 years). All animals showed peridomiciliar habits and the free access to street was  
174 registered in 10 cases. At the moment of the initial diagnosis, 10 dogs showed a good  
175 general state and four showed 1 or 2 clinical signs compatible with CanL, such as:  
176 weight loss (2), lymphadenomegaly (1), splenomegaly (2). One animal (n° 799) showed  
177 cutaneous scar in the scrotum. The monitoring 3, 6 and 12 months after the *T. caninum*  
178 infection diagnosis was done in 8, 3 and 1 dogs, respectively. The other dogs could not  
179 be found or were taken to other regions. Only one dog (n° 732) had its clinical status  
180 changed at 6 months when it showed lymphadenopathy, splenomegaly, conjunctivitis  
181 and hair loss, compatible with clinical signs of CanL.

182

183 *3.2 Serological tests*

184 At the moment of the initial diagnosis, anti *T. caninum* antibodies were detected in  
185 10 animals by IFAT, with titles varying from 1:40 to 1:640 and in 8 by ELISA.  
186 Employing the specific kits for CanL diagnosis, 2 animals (n° 732 and 799) were  
187 seroreactors to IFAT, respectively with titles of 1:40 and 1:80. With EIE all animals  
188 were negative and with DPP only the animal n° 732 showed a positive result.

189

190 *3.3 Parasitological tests*

191 *T. caninum* was isolated from the skin of the 14 animals evaluated in this study. The  
192 cutaneous scar (only dog n° 799), blood and bone marrow cultures processed in this

193 same occasion were negative for the presence of this parasite in all cases. Three months  
194 after, *T. caninum* was reisolated from skin fragments of the all 8 dogs reexamined. The  
195 attempt to reisolate *T. caninum* from the skin at 6 months (3 cases) and 12 months (1  
196 case) did not succeed. Blood and bone marrow samples collected for the culture at 3, 6  
197 and 12 months, respectively in 3, 3 and 1 animal were negative, except in one case  
198 where *L. chagasi* was isolated from the dog n° 732 in bone marrow at 6 months.

199 The smear examinations of the blood, bone marrow and lymph node samples  
200 collected in the initial diagnosis and during monitoring were negative, except the dog n°  
201 732, from which amastigote forms were viewed in the bone marrow sample collected  
202 after 6 months.

203

#### 204 *3.4 Molecular assays*

205 Nested-PCR tests (18S rDNA) done with skin fragments of the 14 dogs, collected  
206 at the moment of the initial diagnosis, showed positive results with amplification  
207 products similar to *T. caninum* in 12 cases, having two animals (n° 604 and 732) shown  
208 negative results. The blood, bone marrow and lymph node samples were negative for *T.*  
209 *caninum* amplification pattern in all cases. However, one animal (n° 732) showed an  
210 amplification product similar to *L. chagasi* for the bone marrow sample. When these  
211 samples were analyzed for the research of *Leishmania* specific DNA, only the bone  
212 marrow sample of animal n° 732 was positive.

213 In the monitoring done 3 months later, the skin fragments collected from 8 dogs, 4  
214 showed PCR positive for *T. caninum* (n° 527, 798, 799 e 808), whereas the research of  
215 *Leishmania* DNA was negative in all 8 cases. The research of *T. caninum* and  
216 *Leishmania* DNA was negative for blood, bone marrow and lymph node samples of 3  
217 dogs examined in this interval. After 6 months *T. caninum* DNA was not detected in

218 skin, blood, bone marrow and lymph node samples of 3 animals reevaluated.  
219 Nevertheless, a pattern of amplification similar to *L. chagasi* was detected in bone  
220 marrow and lymph node samples of the animal n° 732 and in the cutaneous scar and  
221 lymph node samples of the animal n° 799. By PCR specific assay, *Leishmania* DNA  
222 was found in these samples, having the others samples shown negative results. After 12  
223 months the only animal (n° 604) reevaluated showed negative results for both PCR  
224 assays for all samples analyzed.

225 In the PCR assay for  $\beta$ -globin, all samples were positive, showing an amplification  
226 product of about 118 bp.

227 The all results obtained can be found in Table 1. The pattern of amplification of *T.*  
228 *caninum* and *Leishmania* by PCR assays can be observed in the Figure 1.

229

## 230 **Discussion**

231 *T. caninum* is a recent parasite described and its accurate diagnosis is still a  
232 challenge. In all cases reported so far, *T. caninum* infection has been established from  
233 the culture of dog skin fragments, however, in all these occasions, the aim was the CanL  
234 diagnosis (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011; Almeida et al,  
235 2011). Although the culture has not been normally applied in canine surveys, a  
236 prevalence of 3.19% and 5.23% of *T. caninum* infection has been described in two areas  
237 of Rio de Janeiro (Pinto et al., 2010). Using the same technique in Cuiabá city, Almeida  
238 et al., (2011) have found a prevalence of 3.25%. This data suggest that the prevalence of  
239 *T. caninum* may be low or that such rates are influenced by other reasons. In fact, both  
240 the technique and the biological sample analyzed interfere on the sensitivity and  
241 specificity of the diagnostic test, and consequently on the infection prevalence rates  
242 (Morales-Yuste et al., 2012).

243 In the 14 animals analyzed in this study, 71% showed a good general state, even  
244 during the monitoring. Relevant clinical signs have been found in only one case co-  
245 infected by *L. chagasi* and then attributed to CanL. The results obtained here associated  
246 to previous observations make it possible to suggest that the infection by *T. caninum*  
247 may course without specific clinical signs and be transitory or could course with low  
248 parasitemia making the detection difficult by the methods used up to the moment.

249 It is curious to mention that the first case of the infection by *T. caninum* was in one  
250 dog co-infected by *L. braziliensis* in Rio de Janeiro (Madeira et al., 2009) and we now  
251 report the co-infection by *T. caninum* and *L. chagasi*, confirming the overlapping  
252 endemic areas for both agents in Cuiabá city.

253 The lack of knowledge about the biological cycle of *T. caninum* restricts the choice  
254 of biological samples to be analyzed and of more appropriate tools for its diagnosis.  
255 Considering the limitation of the culture sensitivity, and the PCR results obtained in this  
256 study, we showed, once more, the particularity of *T. caninum* to be found exclusively in  
257 intact skin (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011). Interesting  
258 finding was to note that PCR showed negative results for *T. caninum* DNA in skin  
259 fragments of two dogs, whose culture was positive in the same occasion. Although it  
260 has already been observed in CanL (Figueiredo et al., 2010), it can be partially  
261 explained also by not knowing of the evolutive form of *T. caninum* in this site.  
262 Furthermore, there is evidence that inhibitors an interfering role during PCR assays, and  
263 the use of the internal control in this work was important to increase the confidence in  
264 our results.

265 *T. caninum* is a parasite yet little studied and species-specific molecular targets are  
266 not available. Here, the use of targets for the region of the ribosomal gene (18S rDNA),  
267 despite being general, was enabled to detect *Leishmania* DNA in two dogs, whose result



268 was confirmed by other tests. This finding shows that the combination of methods may  
269 be useful when the agents are rarely studied, such as *T. caninum* and confirmed two co-  
270 infection cases.

271 The humoral immune response in the infection by *T. caninum* has been low or  
272 absent (Alves et al., 2012) and our results corroborate this observation, showing that of  
273 14 dogs naturally infected by this parasite, 43% were seronegative, even applying  
274 homolog antigen in the tests. This data can be correlated to the characteristic of *T.*  
275 *caninum*, whose presence seems to be limited and restricted to skin. Unlike, in CanL the  
276 presence of *L. chagasi* in different organs and tissues is had as one of the responsible  
277 factors responsible for the high humoral immune response (Martinez et al., 2011). The  
278 low humoral response observed in the *T. caninum* infection may, on one hand, limit the  
279 variety of options for its diagnosis, but, on the other hand, is a positive issue,  
280 considering that serology constitutes the recommendation for CanL diagnosis in Brazil  
281 (Ministério da Saúde, 2006). Among the dogs studied only the animals co-infected by  
282 *Leishmania* have reacted to specific tests for CanL.

283 The monitoring of dogs in endemic areas is a hard task. Dogs are animals that are  
284 usually taken from one area to another, which constitutes one of the reasons for the  
285 geographic expansion of some zoonosis that have the dog as a dispersion element  
286 (Baneth et al., 2008; Colwell et al., 2011), for instance, the visceral leishmaniosis  
287 (Marzochi et al., 2009). Although *T. caninum* is apparently not pathogenic to dogs, it  
288 may represent more one agent in this complicated context (Barros et al., 2012). Thus, it  
289 is important that the infection dynamics in this host be particularly known about the  
290 possibility of this phenomenon interfering in the control of visceral leishmaniasis in  
291 Brazil.

292

293 **Conflict of interest**

294 The authors have no conflict of interest

295

296 **Acknowledgments**

297 This study was funded in part by grants from Conselho Nacional de  
298 Desenvolvimento Científico (CNPq, process nº 474894/2010-0), Fundação de Amparo a  
299 Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, 26102321-2009/bolsa) and the  
300 Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Mato Grosso (FAPEMAT). M.C.A.  
301 Marzochi and A. Schubach are the recipients of fellowships from CNPq.

302

303 **References**

- 304 Almeida, A.B.F., Sousa, V.R., Boa-Sorte, E.C., Figueiredo, F.B., de Paula, D.A.,  
305 Pimentel, M.F., Dutra, V., Madeira, M.F., 2011. Use of parasitological culture to  
306 detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. Vector Borne  
307 Zoonotic Dis. 11, 1555-1560.
- 308 Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A.O.,  
309 Madeira, M.F., 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine  
310 visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Res. Vet. Sci.  
311 93, 1329-1333.
- 312 Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine  
313 leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.  
314 Trends Parasitol. 24, 324-330.
- 315 Barros, J.H.S., Almeida, A.B.P.F., Figueiredo, F.B., Sousa, V.R., Fagundes, A., Pinto,  
316 A.G.S., Baptista, C., Madeira, M.F., 2012. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in  
317 areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine  
318 leishmaniasis control? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106, 419-423.
- 319 Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2011. Vector-borne parasitic zoonoses:  
320 emerging scenarios and new perspectives. Vet. Parasitol. 182, 14-21.
- 321 Degraeve, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.G., 1994. Use of  
322 molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review.  
323 Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 89, 463-469.
- 324 Figueiredo, F.B., Madeira, M.F., Menezes, R.C., Pacheco, R.S., Pires, M.Q., Furtado,  
325 M.C., Pinto, A.G., Schubach, T.M.P., 2010. Efficacy of an indirect  
326 immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. Vet. Journal.  
327 186: 123-124.

328 Gomes, A.H., Ferreira, I.M., Lima, M.L., Cunha, E.A., Garcia, A.S., Araújo, M.F.,  
329 Pereira-Chiocola, V.L., 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and  
330 control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 144, 234–241.

331 Grimaldi, G., Teva, A., Ferreira, A.L., Dos Santos, C.B., Pinto, I.S., de-Azevedo, C.T.,  
332 Falqueto, A., 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on  
333 Dual-Path Platform technology (DPP®) CVL rapid test) for the serodiagnosis of  
334 canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 54–59.

335 Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach,  
336 A., de Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M.C.A.,  
337 2009. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact  
338 skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil.  
339 *Parasitol.* 136, 411–423.

340 Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011. Canine  
341 leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit. Vectors.* 4, 2-5.

342 Marzochi, M.C., Fagundes, A., Andrade, M.V., Souza, M.B., Madeira, M.F., Mouta-  
343 Confort, E., Schubach, A.O., Marzochi, K.B., 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de  
344 Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev. Soc. Bras. Med.*  
345 *Trop.* 42, 570-580.

346 Ministério da Saúde., 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.  
347 Brasília, Ministério da Saúde.

348 Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-  
349 Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., 2012. Epidemiological implications of the use of  
350 various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different  
351 characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol. Res.* 111, 155-164.

352 Pinto, A.G.S., Schubach, T.M., Figueiredo, F.B., Baptista, C., Fagundes, A., Barros,  
353 J.H.S., de Paula, C.C., Toma, H.K., Madeira, M.F., 2010. Isolation of *Trypanosoma*  
354 *caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 137, 1653-1660.

355 Quaresma, P.F., Murta, S.M., Ferreira, E.C., Rocha-Lima, A.C., Xavier, A.A., Gontijo  
356 C.M., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of  
357 *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time  
358 PCR. *Acta Trop.* 111, 289-294.

359 Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., Souza, C.M., Figueiredo, F.B., 2011.  
360 Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the  
361 leishmaniasis control program. *Vet. Parasitol.* 179, 257-261.

362 Smith, A., Clark, P., Averis, S., Lymbery, A.J., Wayne, A.F., Morris, K.D., Thompson,  
363 R.C., 2008. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial,  
364 the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia:Potoroidae). *Parasitol.*  
365 135, 1329-1335.

366

367 **Figure legend**

368 **Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis showing the amplified products with representative  
369 samples of the study. **A:** PCR assay that targeted a partial sequence of the 18Sr DNA  
370 gene. Lane 1: DNA ladder 100pb; Lane 2: DNA control of *Trypanosoma caninum*  
371 (MCAN/BR/2003/A27); Lane 3-5: skin samples of dogs 527, 531 and 534; Lane 6:  
372 bone marrow sample of dog 732; Lane 7: cutaneous scar sample of dog 799; Lane 8:  
373 lymph node sample of dog 799; Lane 9: DNA control of *Leishmania chagasi*  
374 (MHOM/BR/1974/PP75); Lane 10: negative control. **B:** PCR assay that the conserved  
375 region of *Leishmania* kDNA minicircles. Lane 1: DNA ladder 100pb; Lane 2: DNA  
376 control of *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75); Lane 3: bone marrow sample  
377 of dog 732; Lane 4: lymph node sample of dog 732; Lane 5: cutaneous scar sample of  
378 dog 799; Lane 6: lymph node sample of dog 799; Lanes 7-9: skin samples of dogs 527,  
379 531 and 534; Lane 10: negative control.

380

**Table1**

Results obtained from parasitological (culture and smears exams) and molecular (18S rDNA and Leishmania-kDNA) assays performed with different biological samples obtained from 14 dogs naturally infected by *Trypanosoma caninum*.

Dog N°	Parasitological tests						Molecular assays - PCR							
	culture			Smears exams			18S rDNA				<i>Leishmania</i> -kDNA			
	blood	bone marrow	skin	blood	bone marrow	Lymph node	blood	bone marrow	skin	Lymph node	blood	bone marrow	skin	Lymph node
527 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
527 <sup>a</sup>	nd	nd	+ (Tc)	nd	nd	nd	nd	nd	+ (Tc)	nd	nd	nd	-	nd
531 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
531 <sup>a</sup>	nd	nd	+ (Tc)	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd
534 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
534 <sup>a</sup>	nd	nd	+ (Tc)	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd
576 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
577 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
604 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
604 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
627 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
669 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
669 <sup>a</sup>	nd	nd	+ (Tc)	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd
732 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	+ (Lc)	-	-	-	+ (Lc)	-	-
732 <sup>b</sup>	-	+ (Lc)	-	-	+	-	-	+ (Lc)	-	+ (Lc)	-	+ (Lc)	-	+ (Lc)
769 <sup>*</sup>	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-	+ (Tc)	-	-	-	-	-
769 <sup>a</sup>	nd	nd	+ (Tc)	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd

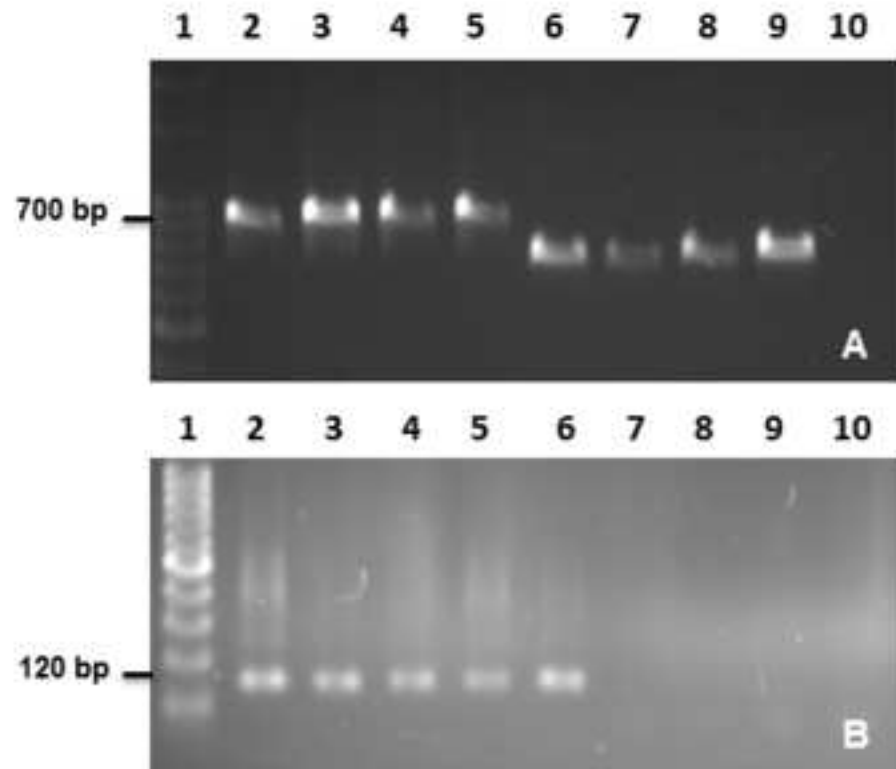
784 <sup>*</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		
798 <sup>*</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		
798 <sup>a</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		
798 <sup>b</sup>	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
799 <sup>*</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		
799 <sup>a</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		
799 <sup>b</sup>	-	-	-		-	-	-	-	-	-		+	(Lc)	-	-	-	+	(Lc)
808 <sup>*</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		
808 <sup>a</sup>	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-	+	(Tc)	-	-	-	-	-		

<sup>\*</sup> Biological samples collected at the same occasion of the initial diagnosis; <sup>a</sup> Biological samples collected after 3 months; <sup>b</sup> Biological samples collected after 6 months after ; <sup>c</sup> Biological samples collected after 12 months; Tc (*Trypanosoma caninum*), Lc (*Leishmania chagasi*), (-) negative results, (+) positive results; nd (not done)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



**NATURAL INFECTION BY *Trypanosoma cruzi* IN ONE DOG IN CENTRAL  
WESTERN BRAZIL – A CASE REPORT**

Arleana do Bom Parto Ferreira de ALMEIDA(1,2), Daphine Ariadne Jesus de PAULA(2), Maria Luisa Paro OTTON(2), Felipe Wolf JAUNE(2), Raquel Aparecida Sales da CRUZ(2), Maria de Fátima MADEIRA(3), Luciano NAKAZATO(2), Adriane Jorge MENDONÇA(2), Caroline Argenta PESCADOR(2) & Valéria Régia Franco SOUSA(2)

**SUMMARY**

It is estimated that about 10 million people are infected with *Trypanosoma cruzi* worldwide, mostly in America Latina and more than 25 million are at risk of acquiring this infection in endemic areas. Dogs are an important reservoir for this pathogen and thus, considered a risk factor for human populations. This report describes one case of Chagas disease in a dog from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. The diagnosis was obtained by direct examination of trypomastigotes cells, DNA amplification by Polymerase Chain Reaction, and sequencing. The animal presented multisystemic signs and died. Although acute Chagas disease in human is not described in Cuiabá, this is the first report of a canine case in this region. This case represents a warning, to health professionals and authorities, to the possibility of transmission of this zoonosis in Cuiabá.

**KEYWORDS:** Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; dog; acute infection; Cuiabá

1. Graduate Program in Clinical Research in Infectious Diseases, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2. Veterinary Medical Clinic Department, UFMT, Cuiabá, MT, Brazil.

3. Surveillance Laboratory for Leishmaniasis, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Correspondence to:** Valéria Régia Franco Sousa. Hospital Veterinário da UFMT. Avenida Fernando Correa da Costa nº2367, 78060-900, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT. Tel: +5565 3615-8662 R.205. E-mail: regia@ufmt.br

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi*, infecta cerca de 10 milhões de pessoas, principalmente na América Latina e mais de 25 milhões apresentam-se em risco de adquirir a doença nas áreas endêmicas. Os cães são considerados importantes reservatórios representando fator de risco para a população humana. Este relato descreve um caso de doença de Chagas em um cão na cidade de Cuiabá. O diagnóstico foi feito a partir do exame direto, apresentando inúmeras formas tripomastigotas, cuja etiologia foi confirmada através do sequenciamento de produtos amplificados pela PCR. O animal apresentou sinais multissistêmicos, evoluindo para óbito. Apesar da doença de Chagas aguda em humanos não ser descrita em Cuiabá, este é o primeiro relato de um caso canino nessa região, fato que, constitui um alerta aos profissionais da saúde e autoridades sanitárias para a possibilidade da transmissão desta zoonose em Cuiabá.

**PALAVRAS CHAVE:** doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*, cão; infecção aguda; Cuiabá

## INTRODUCTION

It is estimated that 10 million people are infected worldwide, by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Chagas disease is endemic in Latin America where more than 25 million people are at risk of acquiring this disease<sup>21</sup>. Chagas disease can be transmitted through excretion from infected insect vectors, blood transfusion, organ transplants, oral transmission, and laboratory accidents<sup>8</sup>. Four cases of human *T. cruzi* acute infection have been reported in the state of Mato Grosso – Midwest Brazilian so far and only infected vectors are found in Cuiabá where no notification of human or canine cases have been described<sup>15</sup>.

Dogs are considered an important parasite reservoir in the domestic cycle, and because their proximity to human beings, they represent a risk factor for the human population<sup>6,11</sup>. Clinically infected dogs can develop both the acute and chronic phases of the disease, similar to the human forms; dogs are indicated as the experimental model for chagasic infection in humans<sup>4,7</sup>.

Dogs frequently present nonspecific clinical signs in the acute phase of this disease; however, the chronic phase is characterized by alterations indicative of dilated cardiomyopathy and right cardiac insufficiency, observed in electrocardiographic (EKG) and echocardiographic (ECG) examinations<sup>14</sup>. According to Bahia et al.<sup>3</sup> and González-Vieyra et al.<sup>10</sup>, this clinical presentation is highly variable and depends on the type of strain involved in the infection, route of infection, and parasite burden. The diagnosis is based on serology, direct or indirect parasitological tests, and molecular tests<sup>2</sup>.

The present report describes the clinical and pathological analyses of a dog naturally infected with *T. cruzi* in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

### **CASE REPORT**

A Brazilian Mastiff female dog, at five years old, from a farm located in the outskirts of Cuiabá, Mato Grosso, was brought to the Veterinary Hospital with a history of hind limbs paresis progressing to quadriparesis for about three days, apathy, and suspected pregnancy. The physical examination indicated normal physiological parameters, abdominal distension, limbs edema, and generalized flaccid paralysis.

The ultrasonography showed three viable fetuses at 47 days of age; the chest radiography showed a bilateral ventricular cardiac enlargement. The hematological

results included hypochromic normocytic anemia, leukocytosis, neutrophilia, lymphopenia, and the presence of trypomastigote forms of *Trypanosoma* sp.. The biochemical tests showed renal profile and alanine aminotransferase within the normal range, increased serum activities of aspartate aminotransferase, and decreased albumin and globulin. Bilirubinuria, occult blood, leukocytes, bilirubin crystals, rare squamous epithelial cells, acidic pH, and normal density were observed in the urinalysis.

The analysis of blood samples in light microscopy showed high amounts of flagellar structures consistent with *Trypanosoma*; blood aliquots were separated and stored at -20 °C for DNA extraction and subsequent polymerase chain reaction (PCR). The cytology of the bone marrow (sternum) and popliteal lymph node revealed the presence of amastigotes forms.

The treatment was established on the second day with diminazene diaceturate at 3.5 mg/kg/day, fluid, and multivitamin support. On the third day worsen clinical signals were observed including hypothermia, anasarca, anorexia, abdominal contractions, vaginal discharge, and vocalization. A second round of hematological analysis and abdominal ultrasonography were performed and revealed increased leukocytosis with neutrophilia, thrombocytopenia, reactive lymphocytes, monocyte, fewer trypomastigotes, and nonviable fetuses. The animal died on the fourth day after presenting dementia, cardiac arrest, and abortion of the fetuses.

Mild hydrothorax and hydropericardium were the main postmortem findings characterized at necropsy. The heart was enlarged and remarkably globoid, with multiple white bands and foci on the epicardium and myocardium , especially in the right ventricle. The right heart chamber was also dilated. Hepatic and pulmonary congestions and enlarged lymph nodes were also observed. The lesions were

microscopically characterized by severe multizonal lymphohistiocytic cellular infiltrates in the myocardium interstice and amastigotes nests surrounded by mononuclear cells (Fig. 1). Additionally, multifocal non-suppurative meningoencephalitis, characterized by lymphocytic cellular infiltrates and moderate mononuclear perivascularitis with pseudocysts in the cerebral cortex, cerebellum, and brain stem, were identified. Other findings included sinusoids hepatic congestion of the central vein, mild mononuclear hepatitis, vacuolization of hepatocytes, severe spleen congestion, and diffuse lymph nodes hyperplasia. No macroscopic or microscopic lesions were found in the digestive tract. Parasitization was observed in examined sections of the liver, lymph nodes, and kidneys.

Chagas disease was confirmed by nested PCR on the 18S rDNA region<sup>19</sup>, and sequencing of the amplified products revealed 100% homology with *Trypanosoma cruzi* strain MT3869 (GenBank accession number AF303660.1). The sequence obtained in this study was deposited in the GenBank (accession number JQ912643).

## DISCUSSION

Dogs might serve as valuable sentinels for the presence of Chagas disease because once infected, they can develop pathological alterations that are similar to those detected in humans. Moreover, they are considered the experimental model of choice for human Chagas disease<sup>4,20</sup>. Clinical signs such as limb edema, flaccid paralysis, and acute death were associated with cardiac and central nervous failure. Myocarditis and meningoencephalitis, in humans and animals, often culminate in death due to myocarditis<sup>16,18</sup>.

Serum biochemistry and blood changes are not specific in Chagas disease; however, in the acute phase, an increased activity of liver enzymes and azotemia occur<sup>8</sup>. The occurrence of leukocytosis has not been reported in *T. cruzi* infections, however, the decrease in total blood cell count due to bone marrow hypoplasia is observed<sup>13</sup>. Regardless of the presence of amastigotes in the bone marrow sample, in this case, the abortion might have caused neutrophilia, possibly due to parasite infection. Congenital infection has been described in infected dogs<sup>17</sup>.

No increase of total serum protein was detected similar to the results described by Barr et al.<sup>5</sup>. The decrease in serum albumin and globulin levels might be related to antigen stimulation caused by another trypanosomatid agent, which could alter the albumin/globulin ratios<sup>1</sup>. The identification of hypoalbuminemia in this case, due to liver disorders, cannot be ignored because of the presence of bilirubinuria and hepatitis on the histopathology results.

The diagnosis of Chagas disease is often missed because of the characteristics of a multisystem infection; however, the number of trypomastigote forms in the acute phase supports the diagnosis<sup>5</sup>. The treatment with diminazene diaceturate shows better results in *T. evansi* infections<sup>12</sup>; nevertheless a significant reduction in the number of trypomastigotes in the bloodstream was observed in this case. This treatment was not sufficient to cure this animal and resulted in the death.

According to Bahia et al.<sup>3</sup> (2002), the clinical presentation might be related to the type of strain involved in the infection. *T. cruzi* circulates in nature as a heterogeneous population complex presenting intraspecific diversity. The PCR analysis the microorganism of this study showed 100% homology with the MT3869 strain that belongs to the *T. cruzi* ZIII strain, described primarily as wild strain. However, reports

of human infection with different clinical presentations of the disease associated with this strain have been described<sup>9</sup>. Despite that there are no records of acute Chagas disease in humans in the city of Cuiabá, this is the first report of the disease in dogs in this region representing an alert to health professionals and authorities on the possibility of transmission of this zoonosis.

## REFERENCES

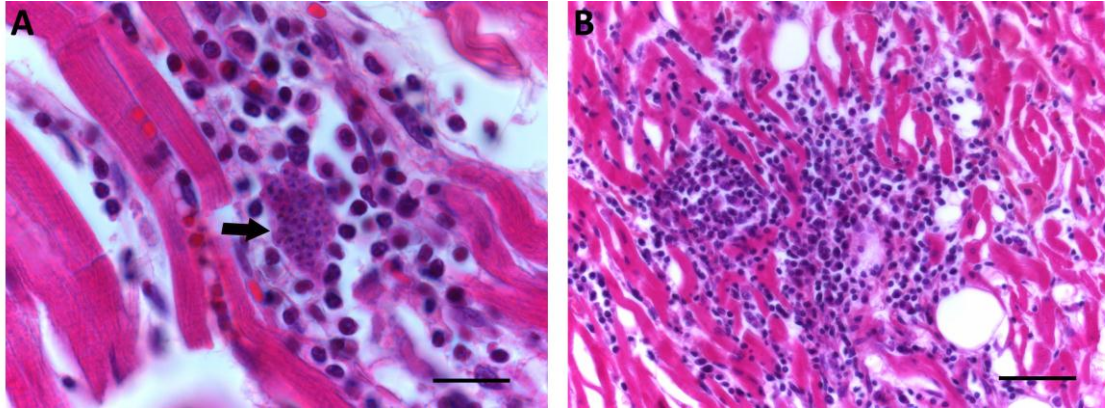
1. Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005;127:227-232.
2. Araújo FMG, Bahia MT, Magalhães NM, Martins-Filho OA, Veloso VM, Carneiro CM, *et al.* Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop.* 2002;81:21-31.
3. Bahia MT, Tafuri WL, Caliarí MV, Veloso VM, Carneiro CM, Coelho GLLM, *et al.* Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(4):339-345.
4. Barbabosa-Pliego A, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck S, Velásquez-Ordoñez V, *et al.* *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacán) is pathogenic: a dog model. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:390-395.



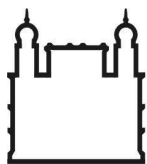
5. Barr SC, Gossett KA, Klei TR. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observation of trypanosomiasis in dog infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Vet Res.* 1991;52(6):954-60.
6. Crisante G, Rojas A, Teixeira MMG, Añez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 2006;98:247-254.
7. Cruz-Chan JV, Bolio-González M, Colín-Flores R, Ramirez-Sierra MJ, Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Vet Parasitol.* 2009;162:151-155.
8. Dias JCP, Neto VA, Luna EJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):375-379.
9. Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Pathogens* 2006; 2:226-235.
10. González-Vieyra SD, Ramírez-Durán N, Sandoval-Trujillo ÁH, Vázquez-Chagoyán JC, Monroy-Salazar HG, Barbabosa-Pliego A. *Trypanosoma cruzi* in dogs: electrocardiographic and echocardiographic evaluation, in Malinalco, State of Mexico. *Res Rep Trop Med.* 2011;2:155-161
11. Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domestic dogs and cats as source of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 2007;134:69-82

12. Howes F, Silva AS, Athayde CL, Costa MM, Corrêa MMB, Tavares KCS, *et al.* A New Therapeutic Protocol for Dogs Infected with *Trypanosoma evansi*. *Acta Sci Vet.* 2011;39(3):988.
13. Marcondes MCG, Borelli P, Yoshida N, R Momtchilo. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes infect.* 2000;2:347-352.
14. Pascon JPE, Sousa MG, Camacho AA. Parâmetros ecocardiográficos de cães cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi* (Cepa Colombiana). *Rev Port Ciênc Vet.* 2009;104(569-572):55-60.
15. Paula AM. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas do Estado de Mato Grosso entre 2001 a 2010, março, 2012.
16. Pavarini SP, Oliveira EC, Bandarra PM, Leal JS, Umezawa ES, Rozza DB, *et al.* Miocardite chagásica em caninos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciênc Rural,* 2009;39(4):1243-1247.
17. Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Amato VS, Rassi Júnior A, Luquetti AO, *et al.* Busca retrospectiva da transmissão maternal da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37(6):485-489.
18. Silva AA, Pereira GV, Souza AS, Silva RR, Rocha MS, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-Induced Central Nervous System Alterations: From the Entry of Inflammatory Cells to Potential Cognitive and Psychiatric Abnormalities. *Journal of Neuroparasitology,* 2010; 1:13p. Article ID N100901
19. Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, *et al.* Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the

- brush-tailed *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitology*, 2008;135:1329-1335.
20. Souza AI, Paulino-Junior D, Sousa MG, Camacho AA. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Cienc Rural*, 2008;38(5):1351-6.
21. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>



**Fig. 1:** (A) Histological analysis revealing presence de amastigotes surround by mononuclear cells in myocardium interstice (arrow), stained with hematoxylin-eosin, 100x magnifications; and (B) severe multizonal lymphohistiocytic cellular infiltrates in the myocardial interstitium, 40x magnification.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

## LICENÇA

**LW-1/10**

**Certificamos que o protocolo (P-52/09-3), intitulado "Avaliação clínica e laboratorial de cães domésticos em áreas com ocorrência de casos de leishmaniose visceral, em Cuiabá, estado de Mato Grosso.", sob a responsabilidade de ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).**

**Esta licença tem validade até 01/03/2014 e inclui o uso total de :**

***Canis familiaris***

- 215 Machos.
- 215 Fêmeas.

**Rio de Janeiro, 1 de março de 2010**

**Drº Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora**

# Leishmaniose Canina em Cuiabá

Data: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

## Identificação do Animal

Nome: _____	Raça: _____	Sexo: _____	Idade: _____
Pelagem: Curto ( )	Longo ( )	/	Castração: Sim ( ) Não ( )

Proprietário: _____	Fone: _____
Endereço: _____	
Bairro: _____	Cidade: _____ Zona: _____

## Exame Clínico

Estado Geral:	Bom ( )	Regular ( )	Ruim ( )
Condição Corpórea:	Muito magro ( )	Magro ( )	Normal ( )
	Obeso ( )		
Mucosas:	Hipocoradas ( )	Normocoradas ( )	Hiperêmicas ( )
	Ictéricas ( )		
Desidratação:	Ausente ( )	Leve ( )	Severa ( )
Prenhez:	Sim ( )	Não ( )	
Presença de Ectoparasitas:	Não ( )	Piolhos ( )	Pulga ( )
	Carrapatos ( )	Outros: _____	
Lesões Cutâneas:	Sim ( )	Não ( )	
Início das Lesões: _____		Nº de Lesões: _____	
Localização das Lesões:	Orelha ( )	Nariz ( )	Escroto ( )
	Outro: _____		
Uso de Medicamento:	Sim ( )	Não ( )	
	Especificar: _____		

## Sinais Clínicos

Sintomático ( )	Assintomático ( )	Oligossintomático ( )
Apatia ( )	Anorexia ( )	Caquexia ( )
Emagrecimento ( )	Esplenomegalia ( )	Hepatomegalia ( )
Linfadenopatia Local ( )	Linfadenopatia generalizada ( )	Onicogrifose ( )
Epistaxe ( )	Atrofia muscular ( )	
Artralgia ( )	Paresia dos Membros Posteriores ( )	
Edema de Membros ( )	Dor a palpação Renal ( )	
Distúrbios Urinários ( )	Especificar: _____	
Oftalmopatia ( )	Especificar: _____	
Dermatopatia ( )	Alopecia local ( )	Alopecia generalizada ( )
Pêlo opaco ( )	Descamação ( )	Alopecia periocular ( )
Úlcera de ponta de orelha ( )	Nódulos cutâneos ( )	Úlceras cutâneas ( )
Hiperqueratose ( )		
Outros: _____		

## Aspectos Demográficos

Local/cidade de origem:	Cuiabá ( )	Outros ( )	Especificar: _____
Há quanto tempo reside com a família:	≤ 1 ano ( )	> 1 ano ( )	
Função na casa:	Guarda ( )	Companhia ( )	Caça ( )
Permanência na casa:	Dentro ( )	Quintal ( )	Nasceu na casa: Sim ( ) Não ( )
Tem acesso à rua:	Sim ( )	Não ( )	Presença de carrapato: Sim ( ) Não ( )
Convive com outros animais:	Sim ( ) Não ( )	Outros animais possuem feridas:	Sim ( ) Não ( )
	Cão ( ) Gato ( )		
Pessoas da casa possuem feridas:	Sim ( ) Não ( )	Vacinado: Leishmune® ( )	Outros ( ) Não ( )
Proximidade com:	Mata ( )	Terreno Baldio ( )	Rio/Córrego/Represa ( ) Não ( )
	< 100 metros	> 100 metros	
Galinheiro/chiqueiro na casa:	Sim ( ) Não ( )	Plantação (banana, etc) na casa:	Sim ( ) Não ( )
Mosquito palha na residência:	Sim ( ) Não ( )	Tem acesso à zona rural*:	Sim ( ) Não ( )
		Frequentemente ( )	ou Esporadicamente ( )
Proprietário conhece a doença:	Sim ( ) Não ( )	Animal doente na vizinhança:	Sim ( ) Não ( )
Pessoa doente na vizinhança:	Sim ( ) Não ( )	Visita do CCZ:	Sim ( ) Não ( )
Coleta pública de Lixo:	Sim ( ) Não ( )	Detetização da residência:	Sim ( ) Não ( )

\* Residência localizada em ambiente urbano

## Material Coletado

Biópsia para Cultura:	Pele de Orelha ( )	Pele de Escápula ( )	Lesão ( )
	Não Coletado ( )		
PCR:	Pele integra ( )	Lesão ( )	Linfonodo ( )
	Medula óssea ( )	Sangue ( )	
Citologia:	Linfonodo ( )	Medula óssea ( )	
Cultura:	Medula Óssea ( )	Linfonodo ( )	Sangue ( )
Imunohistoquímica:	Pele ( )		
Sorologia	Sim ( )	Não ( )	

## Observações

---

---

---

---

---

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

A447 Almeida, Arleana do Bom Parto Ferreira de

Ocorrência de *Leishmania chagasi* e outros tripanosomatídeos em cães de Cuiabá, Mato Grosso: avaliação clínica e uso de diferentes métodos de diagnóstico laboratorial / Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida. – Rio de Janeiro, 2012.

**viii, 147 f. : il. ; 30 cm.**

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2012.  
Bibliografia: f. 125-142

1. *Leishmania chagasi*. 2. *Trypanosoma caninum*.  
3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Cão. 5. Diagnóstico. 6. Cuiabá, MT. I. Título.

**CDD 636.70896936**