



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

ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA PINTO

**AVALIAÇÃO DO ELISA *IN-HOUSE* E DA REAÇÃO EM  
CADEIA DA POLIMERASE COMO FERRAMENTAS  
DIAGNÓSTICAS PARA *Trypanosoma caninum* EM CÃES  
DOMÉSTICOS**

Rio de Janeiro

2014

**AVALIAÇÃO DO ELISA *IN-HOUSE* E DA REAÇÃO EM  
CADEIA DA POLIMERASE COMO FERRAMENTAS  
DIAGNÓSTICAS PARA *Trypanosoma caninum* EM CÃES  
DOMÉSTICOS**

ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA PINTO

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, sob a orientação da Dra. Maria de Fátima Madeira e da Dra. Helena Keiko Toma.

Rio de Janeiro

2014

ANDRESSA GUIMARÃES DE SOUZA PINTO

**AVALIAÇÃO DO ELISA *IN-HOUSE* E DA REAÇÃO EM  
CADEIA DA POLIMERASE COMO FERRAMENTAS  
DIAGNÓSTICAS PARA *Trypanosoma caninum* EM CÃES  
DOMÉSTICOS**

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 Fátima Madeira  
Dra. Helena Keiko Toma

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi (Presidente) IPEC/Fiocruz

---

Dr. Otílio Machado Pereira Bastos (Componente) UFF

---

Dr. Eliame Mouta Confort IPEC/Fiocruz

---

Dr. Rodrigo Caldas Menezes IPEC/Fiocruz

---

Dr. Fabiano Borges Figueiredo IPEC/Fiocruz

---

Dr. Fernanda Nunes Santos (Suplente) ENSP/Fiocruz

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe  
e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito para ser insignificante.*

Augusto Branco

**Dedico esta tese**

***À minha família por todo amor e apoio.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram e me apoiaram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

A Deus pela saúde e força nesses 4 anos.

À minha orientadora Fátima pelos anos de convivência no laboratório, pelos ensinamentos das técnicas desde a época de estagiária em que tive oportunidade de aprender muito. Obrigada pela experiência nos projetos, durante o mestrado e doutorado, por sua paciência e perseverança em mim, mesmo conciliando o doutorado e o emprego. Muito obrigada por todo seu apoio, compreensão, dedicação e credibilidade para que eu finalizasse a tese de doutorado.

À minha co-orientadora Helena, pela orientação e carinho. Por sua presença doce em todos os seminários que me enchiam de esperança e força.

Aos meus “eternos” chefes Adriano e Camila por me apoiarem desde o início a continuar no doutorado, por me liberarem para fazer todas as disciplinas necessárias mesmo na rotina intensa que o setor sempre teve, apostando em mim, até nos momentos mais difíceis. Obrigada por todas as oportunidades, pelas palavras de apoio e carinho.

Aos meus pais e família, por todo carinho e compreensão nas minhas ausências nesses anos, nos encontros de família e em momentos importantes que não pude me fazer tão presente quanto deveria. Obrigada pelo apoio nas pequenas coisas que fizeram toda a diferença.

Ao Vinicius, por seu amor, por compreender meu “eterno” cansaço, minha falta de tempo para lazer, minhas ansiedades e angústias com os experimentos, com a elaboração dos artigos e com a tese. Sei que foi difícil para você também.

À Cibele, pelos ensinamentos desde a época do laboratório e por todo o apoio até o último momento de gravidez.

Ao Dr. Armando pelo apoio como coordenador do curso e posteriormente pela análise dos meus artigos. Obrigada pelo seu incentivo.

À equipe da zoonoses, em especial Fabiano e Rodrigo que desde o início agregaram valores, conhecimentos e incentivo a continuidade e finalização desta tese.

À Aline Fagundes e sua equipe, em especial Alessandra pelos ensinamentos.

À Eliame e sua equipe, em especial Andreia e Fernanda pela disponibilidade nos ensinamentos das técnicas e análise dos resultados.

A todos do serviço de Parasitologia do IPEC pelas palavras de apoio e pela troca de conhecimentos.

A todos do Serviço de Vigilância pelo dia a dia, pela troca de experiências, pelo apoio, pelos momentos de descontração.

Ao Otávio, do Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral, pelo apoio na utilização dos equipamentos e confiança quando precisei após o expediente e nos finais de semana.

Às minhas companheiras de doutorado pelos momentos que tivemos oportunidade de estar juntas, durante as disciplinas e experimentos.

Ao ensino, em especial Marcelo, Susy e Priscilla, por todo apoio, paciência e esclarecimentos durante todos esses anos.

Ao meu chefe, Dr. Marcos Freire e ao Diretor Dr. Artur Couto pela oportunidade de crescimento profissional.

A todos do NBIOS que com muito profissionalismo se dedicaram em suas áreas. Trabalho foi o que não nos faltou, mas sem vocês, tudo seria mais difícil. Obrigada pela compreensão e pela paciência.

Aos meus amigos pelas palavras de incentivo e por compreenderem o meu distanciamento e a falta de tempo nesses anos.

A todos os professores pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz pela oportunidade de crescimento profissional.

À equipe da plataforma de sequenciamento (PIDTIS/Fiocruz) pelo apoio na realização dos experimentos.

À Fiocruz pelas oportunidades de capacitação durante todos esses anos.

Aos colegas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos animais que fizeram parte deste estudo.

A todos que torceram por mim.

O meu MUITO OBRIGADA!

PINTO AGS. **Avaliação do ELISA *in-house* e da Reação em Cadeia da Polimerase como ferramentas diagnósticas para *Trypanosoma caninum* em cães domésticos.** Rio de Janeiro, 2014. 70 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

*Trypanosoma caninum* é uma espécie recentemente descrita em cães no Brasil. Ferramentas acuradas para o diagnóstico desse agente ainda não foram plenamente estabelecidas e a possibilidade de confusão com o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido uma preocupação. O objetivo deste estudo foi avaliar testes sorológicos (ELISA-Tc, EIE-LVC® e DPP®) e testes baseados na amplificação do DNA (PCR-18S rDNA e kDNA) e sequenciamento para investigação diagnóstica da infecção por *T. caninum* e *Leishmania chagasi* em 229 cães. Os cães foram triados durante um senso sorológico para leishmaniose no Rio de Janeiro, Brasil, no ano de 2009, ocasião de coleta das amostras biológicas. A cultura parasitológica de fragmentos de pele foi empregada como padrão de referência e os resultados obtidos foram reunidos em dois artigos científicos. Dos 229 cães estudados, *T. caninum* foi isolado de 11 animais, exclusivamente na pele e *L. chagasi* de 12 animais, em sítios de pele e/ou lesão cutânea. No teste de ELISA-Tc, 39,3% (n=90) cães foram reatores, incluindo 8 dos 11 cães com isolamento de *T. caninum* e 11 dos 12 com isolamento de *L. chagasi*, conferindo ao ELISA-Tc índices de sensibilidade e especificidade de 71,72% e 62,39%, respectivamente. No teste DPP, 5,6% (n=13) cães foram reatores, incluindo 11 dos 12 cães com isolamento de *L. chagasi*, apresentando sensibilidade de 95% e especificidade de 99,08%. Já no EIE-LVC, 8,3% (n=19) cães foram reatores, incluindo todos os 12 cães com isolamento de *L. chagasi*. Esse teste apresentou 100% de sensibilidade e 96,77% de especificidade. Através da PCR-18S rDNA, 15,28% (n=35) cães foram positivos, dos quais 25 apresentaram padrão de amplificação similar à *T. caninum* e 10 padrão similar à *L. chagasi*. Esse resultado foi confirmado pelo sequenciamento. Quando utilizamos a PCR-kDNA, detectamos 14 cães positivos (10 animais positivos pelo 18S rDNA, 12 com isolamento de *L. chagasi* e mais 2 animais que apresentaram resultados negativos na cultura e na PCR-18S rDNA). Nossos resultados mostraram que a cultura parasitológica não detectou todos os cães infectados por *T. caninum* e *L. chagasi*, considerando os dados sorológicos e moleculares aplicados neste estudo. Com relação aos testes sorológicos, verificamos que o ELISA-Tc apresentou acurácia moderada, diferente dos testes de DPP e EIE-LVC que apresentaram índices de sensibilidade e especificidade elevados. Um dado interessante foi verificar que não houve reatividade cruzada ao DPP e ao EIE-LVC dos cães parasitologicamente positivos para *T. caninum*. Os resultados da PCR, pelo 18S rDNA não tiveram concordância com os resultados sorológicos, demonstrando que o diagnóstico acurado da infecção por *T. caninum* não pode ser dado ainda, por uma única ferramenta. De um modo geral, nossos resultados mostraram mais uma vez que *T. caninum* e *L. chagasi* coexistem em cães no Rio de Janeiro; que o ELISA-Tc pode constituir uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico de *T. caninum* e apontam a utilidade da PCR-18S rDNA para o rastreamento molecular, sobretudo em áreas de sobreposição com *L. chagasi*.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma caninum*, cão, diagnóstico, ELISA, PCR, leishmaniose visceral canina.



PINTO AGS. **Evaluation of the in-house ELISA and Polymerase Chain Reaction as diagnostic tools for *Trypanosoma caninum* in domestic dogs.** Rio de Janeiro, 2014. 70 f. Thesis [PhD Thesis in Clinical Research in Infections Diseases] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

### ABSTRACT

Recently, the parasite *Trypanosoma caninum* has been reported in dogs in Brazil. Techniques to accurately diagnose this infection are yet to be fully established, and therefore, the possibility of misdiagnosing canine visceral leishmaniasis (CVL) is a concern. The aim of this study was to evaluate various serological tests (ELISA-Tc, EIE-CVL<sup>®</sup>, and DPP<sup>®</sup>) as well as tests based on DNA amplification (PCR-18S rDNA and kDNA) and sequencing for diagnosis of infections caused by *T. caninum* and *Leishmania chagasi* in 229 dogs in Rio de Janeiro, Brazil. The dogs were screened during a serological survey for leishmaniasis and biological samples were collected. The skin culture was used as the reference control, and the results obtained were gathered in two scientific articles. Out of the 229 dogs studied, *T. caninum* was isolated only from the skin of 11 animals, while *L. chagasi* was isolated from the skin and/or skin lesions of 12 animals. On the basis of the ELISA-Tc test, 90 dogs (39.3%) tested positive. This included 8 of the 11 dogs infected by *T. caninum* species and 11 of the 12 dogs infected by *L. chagasi* strain, thereby displaying ELISA-Tc sensitivity and specificity indices of 71,72% and 62.39%, respectively. In the DPP test, 13 dogs (5.6%) tested positive, including 11 out of 12 dogs infected by *L. chagasi* species, showing a sensitivity and specificity of 95% and 99.8%, respectively. In the EIE-CVL test, 19 dogs (8.3%) tested positive, which included all 12 dogs infected by *L. chagasi* strain. This test showed a sensitivity and specificity of 100% and 96.77%, respectively. Thirty-five dogs (15.28%) tested positive in the PCR-18S rDNA analysis, out of which 25 showed an amplification pattern similar to *T. caninum* and 10 showed a pattern similar to *L. chagasi*. This result was confirmed by DNA sequencing. When we used the PCR-kDNA technique, 14 dogs tested positive (10 dogs tested positive by 18S rDNA, 12 with the *L. chagasi* strain, and 2 more dogs whose culture and PCR results were negative). With regard to the serological and molecular data obtained from this study, we ascertained that the parasitological culture did not detect *T. caninum* and *L. chagasi* infection in all infected dogs. Among the serological tests, the ELISA-Tc showed moderate accuracy that was different from the DPP and EIE-CVL tests, which showed higher sensitivity and specificity indices. Interestingly, there was no cross-reactivity to DPP and EIE-CVL for the *T. caninum*-positive culture dogs. The 18S rDNA PCR results did not agree with the serological results, thereby proving that *T. caninum* infection cannot be accurately diagnosed using a single technique. Overall, our results proved that *T. caninum* and *L. chagasi* do coexist in dogs in Rio de Janeiro and that the ELISA-Tc test can be used as an adjunct for the diagnosis of *T. caninum*. These results also show the usefulness of PCR-18S rDNA for molecular screening especially in regions where to *L. chagasi* and *T. caninum* co-occur.

**Keywords:** *Trypanosoma caninum*, dog, diagnosis, ELISA, PCR, canine visceral leishmaniasis.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DPP – *Dual Path Platform* (Teste imunocromatográfico de dupla plataforma)

EIE-LVC – Ensaio imunoenzimático - Leishmaniose Visceral Canina

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

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

Lc – *Leishmania chagasi*

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV- Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

MLEE – *Multi-locus enzyme electrophoresis* (Eletroforese de isoenzimas)

MS – Ministério da Saúde

NNN – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

rDNA – *Ribosomal Deoxyribonucleic acid* (DNA ribossomal)

rpm – rotações por minuto

SSU – *Small ribosomal subunit* (Subunidade menor ribossomal)

Tc – *Trypanosoma caninum*

Vigileish – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Trypanosoma caninum</i> .....	1
1.2. Leishmaniose visceral canina.....	4
1.3. Ferramentas empregadas para o diagnóstico da LVC.....	7
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
<b>4. Material e métodos / Resultados.....</b>	<b>17</b>
4.1. Artigo 1: In-house assessment of ELISA for the diagnosis of <i>Trypanosoma caninum</i> infection in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil.....	18
4.2. Artigo 2: <i>Trypanosoma caninum</i> : diagnostic evaluation of 18S rDNA PCR using skin fragments.....	34
<b>5. Considerações gerais.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>61</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Trypanosoma caninum*

*Trypanosoma caninum* é um parasito recentemente descrito em cães. Foi encontrado pela primeira vez, no bairro de Campo Grande, município do Rio de Janeiro, no ano de 2003 (Madeira et al., 2009) em um cão coinfectado por *Leishmania braziliensis*. Posteriormente, em 2009, foi relatado o encontro desse agente em outros cães nessa região (Pinto et al., 2010). Silva et al. (2011) também demonstraram a presença de *T. caninum* em cães no Rio de Janeiro, levantando a hipótese da ocorrência de um ciclo natural, como já havia sido mencionado no estudo de Madeira et al. (2009) e Pinto et al. (2010). Nesse mesmo ano, Almeida et al. (2011) descreveram o isolamento de *T. caninum* em 14 cães na cidade de Cuiabá/MT, sendo esse o primeiro relato da ocorrência dessa espécie fora do município do Rio de Janeiro, RJ, região onde esse parasito foi descrito pela primeira vez. Barros et al. (2012) descreveram o encontro de *T. caninum* nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Tais relatos reforçam a existência de um ciclo natural desse protozoário entre os cães domésticos. Um dado importante e que será mais adiante discutido, é o fato de *T. caninum* ser encontrado em áreas endêmicas de leishmaniose visceral canina (LVC).

O diagnóstico desse agente tem sido feito, até então, através do seu isolamento em cultura. Todas as amostras mantidas em laboratório foram obtidas exclusivamente de fragmentos de pele íntegra de cães domésticos, não sendo possível o isolamento a partir de

sangue ou outros tecidos. Essa característica biológica apresentada por *T. caninum*, o difere de outros parasitos do gênero *Trypanosoma* e sugere que tal parasito possa habitar tecidos e vasos periféricos (Madeira et al., 2009).

Até o momento foram descritos 53 casos da infecção natural por *T. caninum*, no entanto, ainda não foi possível correlacionar esse dado com aspectos epidemiológicos. Madeira et al. (2009) demonstraram que *T. caninum* não foi capaz de evoluir em triatomíneos do gênero *Rhodnius* e *Triatoma*. Este resultado sugere que outros artrópodes possam atuar como vetores, como é observado no ciclo de outras espécies de tripanossomas, tais como mosquitos, pulgas, carrapatos e possivelmente flebotomíneos.

Outro aspecto importante é a morfologia de *T. caninum* que pode ser facilmente distinguido de outros tripanossomas parasitos de mamíferos, pelo tamanho do comprimento total do corpo. Em cultura apresentam predominantemente formas epimastigostas, esferomastigotas e tripomastigostas. Recentemente, formas epimastigostas atípicas sem flagelo livre, foram descritas no cultivo axênico. Essa característica morfológica também é um fato incomum para os representantes do gênero *Trypanosoma* (Barros et al., em fase de publicação).

A maioria dos animais infectados por *T. caninum* descritos até então, apresentaram-se saudáveis, sugerindo que tal parasito talvez não seja patogênico para cães (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010). Entretanto, apesar disso, o parasito pode estimular o sistema imune do cão, induzindo a produção de anticorpos e assim, reagir especificamente e de forma cruzada com outras espécies de tripanossomatídeos, sobretudo do gênero *Leishmania* (Alves et al., 2012). Além disso, estudos preliminares apontam que a infecção por *T. caninum* possa ser transitória e cursar com baixa parasitemia (Madeira et al., 2014).

Estudos moleculares de *T. caninum* ainda são escassos e resultados obtidos com os 53 isolados de *T. caninum* descritos até então, apresentam o mesmo padrão genético, independente

da procedência geográfica. Esse resultado sugere que este parasito componha uma população homogênea (Barros et al., em fase de publicação).

Diante desse cenário, diversos estudos vêm sendo feitos, objetivando maior conhecimento sobre este parasito. Alves et al. (2012) padronizaram o teste de ELISA *in house* utilizando antígenos homólogos para avaliação da resposta imune humoral dos animais infectados. Seus resultados demonstraram que o teste não foi capaz de detectar todos as infecções, sugerindo que o parasito não induza uma boa resposta humoral. Nos estudos de Pinto et al. (2010), Silva et al. (2011) e Alves et al. (2012) foi observada reação sorológica cruzada de *T. caninum* com *Leishmania* sp., quando empregados os testes convencionais da rede pública de saúde (IFI e ELISA). Os animais que reagiram a esses testes foram eutanasiados e não foi isolado *Leishmania* sp., somente *T. caninum* sugerindo que estes cães tenham sido eutanasiados indevidamente. Atualmente, existe grande preocupação que *T. caninum* possa confundir o diagnóstico, já que compartilha o mesmo hospedeiro e é encontrado na pele dos cães infectados. Além disso, todos os casos foram descritos em regiões endêmicas de LVC.

A sobreposição de áreas onde *T. caninum* e *L. chagasi* circulam tem sido apontado como um possível problema no controle da LVC. Além disso, esta sobreposição também favorece o aparecimento de infecções mistas. No Brasil, a coinfeção natural de cães domésticos, com diferentes espécies de tripanossomatídeos tem sido registrada. No estado de Mato Grosso, área endêmica para *L. chagasi* e *T. evansi*, um caso de coinfeção por ambas as espécies foi descrito (Savani et al., 2005). No município do Rio de Janeiro, Madeira et al. (2006) e Silva et al. (2011) descreveram alguns casos de coinfeção por *L. braziliensis* e *L. chagasi* em cães. O aparecimento de infecções mistas muitas vezes confunde o diagnóstico, uma vez que nem sempre a demonstração direta do parasito é possível. Por outro lado, a correta descrição dos agentes envolvidos é fundamental para ações de vigilância.

Esses fatos chamam atenção para a necessidade de aplicação de métodos diagnósticos de maior especificidade que possam discriminar diferentes membros da família Trypanosomatidae uma vez que as ferramentas sorológicas empregadas no diagnóstico de LVC não permitem essa diferenciação.

## 1.2. Leishmaniose visceral canina

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) constitui um grave problema de saúde pública devido a sua ampla distribuição geográfica, ao elevado número de casos e a gravidade de suas formas clínicas. É uma zoonose que acomete seres humanos e outras espécies de animais domésticos e silvestres, causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, cujo principal vetor incriminado pela transmissão é *Lutzomyia longipalpis* (Ministério da Saúde, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que *L. (L.) chagasi*, agente da leishmaniose visceral nas Américas (LVA) possui elevada similaridade genética com *L. (L.) infantum*, espécie responsável pela leishmaniose visceral zoonótica na região do Mediterrâneo (Europa e África) (Mauricio et al., 2000; Lukes et al., 2007). Por essa razão alguns autores já utilizam a denominação *Leishmania infantum* para o agente da LVA, considerando que constituem a mesma espécie. Embora de acordo com tais argumentos, em nosso estudo utilizaremos a denominação de *L. chagasi* (sin. *L. infantum*).

Os cães domésticos constituem o principal reservatório urbano do agente. O primeiro caso de leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil foi descrito por Chagas et al. (1938). Na década de 50, Deane e Deane (1955) constataram a presença de formas amastigotas na pele de cães infectados e desde então esses animais têm sido incriminados no ciclo de transmissão da doença, atuando na manutenção e amplificação do ciclo doméstico (Marzochi et al., 1985; Paranhos-Silva et al., 1998; Marzochi et al., 2009). Ao contrário do que ocorre no ciclo

epidemiológico da LV, na leishmaniose tegumentar (LT) o cão tem sido incriminado apenas como eventual hospedeiro, uma vez que seu papel como reservatório doméstico não pode ainda ser comprovado (Reithinger e Davies, 1999; Dantas-Torres, 2009).

Os cães quando infectados por *L. chagasi*, podem apresentar quadros clínicos variados e em alguns casos a doença pode permanecer latente levando até a cura espontânea (Marzochi et al., 1985; Tafuri et al., 2001; Colmenares et al., 2002). O desenvolvimento das manifestações clínicas está condicionado com a imunocompetência individual do animal e com a virulência do parasito (Colmenares et al., 2002). Os animais podem apresentar-se desde aparentemente saudáveis a quadros graves de caquexia, associados com outras manifestações clínicas. Os sinais clínicos mais comuns da LVC são alopecia, dermatites, descamações, úlceras cutâneas, onicogribose, ceratoconjuntivite, uveíte, coriza, anemia, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas, vômito, linfadenopatia local ou generalizada, febre, hepatoesplenomegalia até paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte (Alvar et al., 2004; Reis et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2009). De acordo com a ausência ou presença das manifestações clínicas os animais podem ser classificados como assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (Mancianti et al., 1988; Abranches et al., 1991). A forma assintomática é tida como predominante entre os animais naturalmente infectados (Dantas-Torres et al., 2006; Almeida et al., 2009). Entretanto, mesmo que o animal não apresente manifestações clínicas da doença, pode apresentar parasitismo cutâneo, servindo de fonte de infecção para flebotomíneos (Travi et al., 2001).

Devido à importância do cão doméstico na manutenção do ciclo de transmissão de *L. chagasi* e, pela gravidade da doença no homem, ações de controle tentam interromper ou diminuir a transmissão nas áreas endêmicas. Diversos são os focos de ação, mas os cães constituem um dos principais alvos nos programas de controle da doença. Nas áreas endêmicas,



é feito o controle através da identificação e eutanásia de cães soropositivos (Ministério da Saúde, 2006), embora esta estratégia seja ainda questionada por alguns autores (Courtenay et al., 2002; Costa, 2011). Além da eutanásia dos cães sororeatores, o programa para o controle da LV humana assume mais 2 pontos principais: detecção e tratamento dos casos humanos; controle do vetor através de borrifação de inseticida no domicílio e peridomicílio (Ministério da Saúde, 2006).

Devido à possibilidade de deslocamento para outras áreas, os cães são considerados elementos de dispersão de certas zoonoses, podendo carrear agente etiológico de importantes doenças (Cowell et al., 2011). Assim, os cães domésticos também têm sido foco de investigação no ciclo de transmissão de *Trypanosoma cruzi*, principalmente nos países da América Latina (Crisante et al., 2006). Outra espécie, que no Brasil, infecta esses animais é o *Trypanosoma evansi*. A presença de infecção canina por *T.evansi* é tida em algumas situações, como uma fonte de propagação do protozoário (Franke et al., 1994).

Segundo Figueiredo et al. (2012) animais detectados como sororeatores em inquéritos para LVC e transferidos por seus proprietários para outras regiões podem colaborar para expansão da doença em regiões não endêmicas. Estudos têm demonstrado a expansão da LVC para regiões indenes, como o Rio Grande do Sul (Monteiro et al., 2010), Santa Catarina (Figueiredo et al., 2012) e para bairros do município do Rio de Janeiro como Laranjeiras (Figueiredo et al., 2010). A LVC também vem sendo descrita em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro como Maricá, Resende, Volta Redonda (De Paula et al., 2009; Vasconcelos et al., 2013; Campos et al., 2013). Recentemente foi descrito em Barra Mansa 9 casos humanos de LV (Pimentel et al., 2014 - dados em fase de publicação) e inúmeros de casos caninos (Mello et al., 2014- dados em fase de publicação). Todos esses relatos confirmam a expansão da LV no Brasil.

Diferente do que ocorre na LV humana, para os cães domésticos não existe tratamento reconhecido pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2008). Propostas alternativas para o controle da LVC têm surgido devido aos questionamentos da eutanásia, já que parece não conter o avanço da doença (Courtenay et al., 2002; Costa, 2011; Dantas-Torres et al., 2012). Dentre essas propostas estão o uso de coleiras impregnadas com inseticida (Killick-Kendrich et al., 1997) e estímulos para o desenvolvimento de vacinas (Da Silva et al., 2000; Borja-Cabrera et al., 2004).

No município do Rio de Janeiro, a leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV) são descritas em várias regiões com inúmeros casos caninos identificados, sendo cada vez mais comuns relatos da ocorrência de sobreposição de ambas as formas da doença (Marzochi et al., 1985; Madeira et al., 2006; Silva et al., 2011).

### **1.3. Ferramentas empregadas para o diagnóstico da LVC**

#### *a) Testes parasitológicos*

Testes parasitológicos são considerados como testes definitivos, já que consiste na demonstração direta ou indireta do agente. Na LVC, os métodos citológicos são muito empregados, devido a sua simplicidade e baixo custo do método, podendo ser feito com diferentes amostras tais como medula óssea, pele, lesão, linfonodos, baço, entre outros (Tafari et al., 2001; Alvar et al., 2004). O isolamento em meio de cultura “in vitro” é considerado o padrão de referência. Pode ser feito também, com diferentes amostras clínicas. O clássico meio de NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) é o mais comumente empregado, acrescido da fase líquida (meio Schneider). A sensibilidade da cultura é muito variável e pode estar condicionada a inúmeros fatores, entre eles, a possibilidade de contaminação (Maia e Campino, 2008). O isolamento, além de ser um fato importante para o diagnóstico, é primordial para a

caracterização da espécie. Nas leishmanioses, a eletroforese de isoenzimas é considerada padrão de referência para esta caracterização (Cupolillo et al., 1994).

Outras metodologias como a imunohistoquímica e análise histopatológica também são muito utilizadas (Moreira et al., 2007; Calabrese et al., 2010). A imunohistoquímica é considerada um teste de detecção indireta do parasito para o qual se utilizam anticorpos anti-*Leishmania* ligados a conjugados marcados. A presença do agente etiológico é revelada por meio de uma reação enzimática em preparações histológicas com colorações específicas (Xavier et al., 2006). A imunohistoquímica tem revelado um aumento na sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC, podendo ser utilizada para acompanhamento da evolução da doença (Tafari et al., 2004). Entretanto, é um método que não permite a identificação de espécie presente (Menezes et al., 2013).

#### *b) Testes Sorológicos*

Os métodos sorológicos são muito utilizados para avaliação da prevalência de LVC através dos inquéritos. Para o controle da LV, o Ministério da Saúde recomenda a identificação e eliminação de cães infectados, cujo diagnóstico é feito por meio de testes sorológicos (Ministério da Saúde, 2006). Essa estratégia possui valor limitado em áreas onde circulam outros tripanossomatídeos, uma vez que os diferentes membros dessa família compartilham proteínas que reagem de forma cruzada aos testes sorológicos (Vexenat et al., 1996). Em estudos sorológicos, realizados com cães de áreas endêmicas de sobreposição de LT e LV, a reatividade cruzada é um dos pontos bastante comentado e discutido (Ijagbone et al., 1989; Ferec et al., 1990; Rosypay et al., 2007; Caballero et al., 2007; Gonçalves et al., 2002).

Nos inquéritos sorológicos para o diagnóstico e controle da LVC, até 2011, eram empregados o ensaio imunoenzimático como teste de triagem e a imunofluorescência indireta

(IFI) como teste confirmatório (Ministério da Saúde, 2006). Ambos os métodos consistem na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* presentes no soro, através da reação antígeno-anticorpo. A IFI é realizada com base em diluições seriadas do soro do hospedeiro na presença de antígenos de promastigotas de *Leishmania* sp. Os resultados são interpretados com base em uma reação fluorescente que ocorre a partir da ligação de anticorpos anti-*Leishmania* com antígenos do parasito (Shaw e Voller 1964; Gradoni, 2002). O resultado da IFI normalmente é expresso em diluições e para critério de indicação de eutanásia, o título acima de 1:40 é considerado positivo. A técnica apresenta como desvantagem não ser um teste automatizado e por vezes apresentar leituras subjetivas.

O ELISA é uma reação imunoenzimática colorimétrica com unidades de absorvância a um raio de luz, expresso em densidade óptica. O resultado é expresso mais comumente, como “reagente” ou “não reagente”, o que torna a leitura mais objetiva. O teste ELISA permite a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo, seu protocolo pode ser facilmente adaptado para a utilização de diferentes antígenos e a leitura é automatizada (Voller et al., 1976; Reithinger et al., 2002). Esta técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade, entretanto no período latente da doença a sensibilidade é reduzida (Mancianti et al., 1995; Courtenay et al., 2002). O kit ELISA (EIE-LVC), distribuídos para o serviço público no Brasil, usam antígeno de *Leishmania major*-like. Porém a substituição deste antígeno pelo antígeno homólogo de *L. chagasi* está em discussão, uma vez que no Brasil a LVC é causada por *L. chagasi* e a utilização de antígenos homólogos poderiam melhorar a especificidade dos testes sorológicos.

As técnicas sorológicas apesar de constituírem importante ferramenta diagnóstica, possuem como desvantagem a possibilidade da ocorrência de reatividade cruzada e a ausência do poder de discriminação entre as leishmanioses tegumentar e visceral (Vale et al., 2009) e

outras tripanossomíases (Savani et al., 2005). No estudo de Viol et al. (2012), o ELISA e a IFI apresentaram baixa sensibilidade em relação a PCR. Esse dado também foi evidenciado por Ashford et al. (1995) e Santos et al. (2010). Troncarelli et al. (2009) usando IFI, PCR e exames parasitológicos diretos de amostras de fígado e baço, observaram que 16,5 % (n=33) de 200 cães examinados possuíam títulos para *Leishmania* sp. e *Trypanosoma* sp., dos quais 90,9 % tinham formas amastigotas de *Leishmania* sp. em esfregaços e todos os animais tiveram PCR negativa para *T. cruzi*. Costa et al. (1991) observaram reação sorológica cruzada entre a infecção por *L. chagasi* e *T. cruzi* em 83,3 % das amostras de cães testadas. Também, no estudo de Viol et al. (2012) os resultados forneceram evidências de reações sorológicas cruzadas entre *Leishmania* sp. e *Trypanosoma* sp.

Segundo Souza et al. (2012) o uso de extratos brutos nos testes sorológicos é limitado por causa da baixa reprodutibilidade e baixos valores de especificidade obtidos. Logo, a precisão destes testes é controversa e o controle baseado nos resultados desses testes parece não conter a propagação da doença (Alves e Bevilacqua, 2004). Recentemente, devido à necessidade de ferramentas de diagnóstico rápidas e confiáveis para a detecção precoce de cães infectados, permitindo assim intervenções eficazes de controle, foi desenvolvido um teste imunocromatográfico - DPP (Dual-Path Platform) (Grimaldi et al., 2012). O DPP é um teste rápido, utilizando tecnologia do DNA recombinante de *L. chagasi*, baseado em uma reação de ouro coloidal com os antígenos rk26/rk39. É um teste rápido, que dura cerca de 15 minutos, empregando pequena quantidade de amostra biológica (sangue ou soro). Esse método se revelou bastante prático para uso no campo, não requerendo estrutura laboratorial. Segundo Grimaldi et al. (2012), este teste apresentou alta sensibilidade e especificidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães assintomáticos para LVC. A partir de 2011, o Ministério da Saúde substituiu o protocolo diagnóstico da LVC e adotou como teste de triagem

o teste imunocromatográfico-DPP e como teste confirmatório o ELISA (Ministério da Saúde, 2011).

É importante ressaltar que, dentro da população canina, pode ocorrer grande variabilidade quanto à resposta imune frente à infecção por *L. chagasi*. Existem cães com altos níveis de anticorpos sendo estes facilmente detectados pelas metodologias disponíveis. Também há animais com claros sinais da doença, porém com sorologia duvidosa ou negativa devido à imunossupressão (Fisa et al., 2001). Existem cães sem manifestações clínicas, com níveis muito variáveis de anticorpos e que manifestam a doença após longo período. Há também animais infectados que são resistentes, caracterizados por apresentarem altos níveis de interferon-gama e que podem permanecer sem sinais clínicos por toda a vida (Alvar et al., 2004). Este panorama complexo gera importantes variações nas medidas de acurácia dos testes sorológicos.

Alves et al. (2012) relataram que o teste de IFI e ELISA não constituem ferramentas adequadas para o diagnóstico e discriminação da infecção por *T. caninum*. Neste mesmo estudo foi observado reações cruzadas de *L. chagasi* e *T. caninum* e relatado que a presença de animais infectados por *T. caninum* em áreas de LVC pode interferir nos índices de especificidade dos testes comerciais para o diagnóstico da LVC (IFI-LVC, EIE-LVC e DPP).

### c) Testes moleculares baseados na PCR

O avanço da biologia molecular possibilitou a introdução de testes mais acurados, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico. Esses testes são baseados na amplificação e detecção de sequências de DNA específicas do parasito, tendo sido descrito como um método eficiente apresentando elevada sensibilidade. A PCR emprega nos ensaios uma enzima termoestável (DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos

iniciadores *primers* e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura, onde ocorre a desnaturação do DNA, hibridização dos oligonucleotídeos às seqüências-alvo e a síntese do DNA, em termocicladores. O DNA amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins. É uma técnica que permite a identificação rápida e eficaz do parasito envolvido na infecção.

A PCR é uma tecnologia bastante flexível, possibilitando uma série de variações e aplicações da técnica. Nesse contexto, podemos citar o RT-PCR (transcriptase reversa-PCR), nested PCR, multiplex PCR, PCR a partir de primers randômicos e PCR em tempo real. O RT-PCR utiliza uma enzima chamada transcriptase reversa para converter uma amostra de RNA em cDNA antes da etapa de amplificação por PCR, permitindo estudo de vírus de RNA e análises de expressão gênica. A *nested* PCR, emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de primers internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método. Esta modalidade tem se mostrado rápida, bastante sensível e com um limite teórico de detecção de 0,01 parasito (Cruz et al., 2002). Já PCR multiplex é uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas seqüências-alvo numa mesma amostra. A PCR a partir de primers randômicos utiliza seqüências curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico e é bastante empregado em estudos epidemiológicos. A PCR em tempo real permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente, num sistema fechado, sendo necessário para isto um termociclador que possua sistema de monitoramento de emissão de fluorescência. Esta técnica é empregada tanto para quantificação de amostras, como para testes de carga viral e monitoramento de doença residual mínima (Molina e Tobo, 2004).

A alta sensibilidade da PCR vem superando outras técnicas convencionais para o diagnóstico de uma forma geral. A detecção de fragmentos genômicos, diretamente na amostra clínica, tem provado ser uma ferramenta promissora (Souza-Estani et al., 2009). Sua robustez também tem sido demonstrada com alta especificidade de acordo com o tipo de iniciador utilizado (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001; Manna et al., 2004; Strauss-Ayali et al., 2004).

Para o diagnóstico da LVC, a PCR tem se mostrado mais sensível do que os métodos sorológicos e parasitológicos convencionais (Alves e Bevilacqua, 2004). Várias sequências do genoma de *Leishmania* já foram descritas e incluem os genes para o RNA ribossomal e seus espaçadores intergênicos e, regiões do kDNA (minicírculos e maxicírculos) (Singh, 2006; Reithinger e Dujardin, 2007). Atualmente, abordagens moleculares são utilizadas para o desenvolvimento de vacinas e diagnóstico de leishmaniose (Souza et al., 2012).

Diversos estudos têm sido realizados visando aperfeiçoar e padronizar protocolos de PCR para a diferenciação e rastreamento de novas espécies de tripanossomatídeos (Souto et al., 1999; Noyes et al., 1999; Hamilton et al., 2004; Deborggraeve et al., 2008; Smith et al., 2008).

Devido à ampla diversidade genética dos parasitas da família Trypanosomatidae, o conhecimento de regiões variáveis e conservadas no genoma destes organismos tem um imenso valor. Assim, inúmeros alvos, espécies-específicos ou genéricos, que potencialmente podem reconhecer todas as espécies de tripanossomas têm sido descritos. Entre os alvos genéricos, podemos citar a sequência do gene 24S $\alpha$ rRNA com ampla utilidade em pesquisa com diferentes espécies de tripanossomatídeos (Souto et al., 1999); a pequena e a grande subunidade do DNA ribossomal do gene 18S (Noyes et al., 1999; Deborggraeve et al., 2008; Smith et al., 2008).

As análises podem ser feitas baseadas no tamanho do produto de amplificação obtida pela PCR e através do sequenciamento desses produtos, cujas sequências podem ser



comparadas com estudos prévios de outros parasitos, acessados publicamente no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 2. JUSTIFICATIVA

Por ser *Trypanosoma caninum* um parasito recentemente descrito, é de se esperar que inúmeros aspectos acerca desse agente ainda precisam ser conhecidos, portanto é necessário compreender melhor a dinâmica da infecção por esse parasito para o hospedeiro vertebrado e o estabelecimento de ferramentas que possam diagnosticar com segurança a infecção por *T. caninum* (Madeira et al., 2009). Embora seja uma espécie recentemente descrita, 53 casos da infecção natural em cães já foram registrados em áreas onde a LVC é endêmica. Assim, é fundamental estabelecer, se cães infectados por *T. caninum* podem interferir no controle da LVC. Nesse contexto, o conhecimento de aspectos desse agente será fundamental. Ainda não é possível afirmar se a pele constitui o único alvo para o seu isolamento, embora já seja consenso de vários estudos a obtenção exclusiva desse agente a partir desse espécime clínico (Pinto et al., 2010, Almeida et al., 2011, Barros et al., 2012). Sabemos que a cultura parasitológica possui limitações e, nesse sentido, a utilização de técnicas sorológicas e moleculares talvez possam constituir possíveis alternativas para detecção deste tripanossomatídeo ainda tão pouco conhecido.

O diagnóstico determinado por ferramentas sorológicas apresenta a grande vantagem de ser rápido e contar com amostras biológicas coletadas por métodos pouco invasivos. Entretanto, pode ter o seu resultado limitado, devido à possível reatividade sorológica cruzada com outras doenças, ou mesmo variar de acordo com a fase da infecção. Já os métodos moleculares, devido a sua elevada sensibilidade, têm sido amplamente explorados com fins diagnósticos nos mais variadas doenças e agravos. Ainda não são técnicas automatizadas e disponíveis para o uso em

larga escala, embora sejam métodos eficientes na identificação do agente envolvido na infecção diretamente no espécime clínico analisado (Souto et al., 1999; Noyes et al., 1999; Hamilton et al., 2004; Deborggraeve et al., 2008; Smith et al., 2008).

Apesar do conhecimento de aspectos genéticos de *T. caninum* serem escassos, a utilização da PCR com alvos dirigidos para o gene ribossomal (SSU) mostrou utilidade na detecção do DNA desse agente em amostras de pele coletada de cães infectados (Madeira et al., 2014). Esse fato sugere que a PCR-18S rDNA talvez possa ser uma alternativa para o rastreamento de *T. caninum*, podendo assim estabelecer índices de prevalência nas áreas endêmicas.

Ainda que o diagnóstico de rotina da LVC baseie-se em dados sorológicos, a confirmação da infecção é extremamente necessária, sobretudo em áreas onde circulam outros tripanossomatídeos. Nos últimos anos, tem se verificado a emergência da LV em várias cidades brasileiras, inclusive no estado do Rio de Janeiro, com casos humanos e caninos relatados (Marzochi et al., 2009). Nesse contexto, um fato que não pode ser deixado de lado, é a descrição de *T. caninum*, uma nova espécie de tripanossoma, circulando nessas áreas, infectando cães domésticos. A presença desse agente em diferentes regiões brasileiras demonstra que mais estudos são necessários para conhecer elementos que possam estar contribuindo para a sua propagação e disseminação. A sobreposição geográfica de ambos parasitas, *T. caninum* e *Leishmania* sp., indica a necessidade urgente da aplicação de técnicas visando assegurar a identificação e diferenciação destes agentes na infecção canina.

Assim, considerando o desconhecimento quanto a real importância de *T. caninum* no contexto de saúde pública, este estudo propôs avaliar o desempenho do ensaio imunoenzimático (ELISA) e da PCR como ferramentas diagnósticas para a infecção por *T. caninum* em um grupo de cães provenientes do município do Rio de Janeiro.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o desempenho da técnica de ELISA e da PCR como ferramentas diagnósticas da infecção por *Trypanosoma caninum* em cães domésticos oriundos do município do Rio de Janeiro.

#### 3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar o ensaio de ELISA padronizado *in house* para investigar a reatividade sorológica específica para *T. caninum*, comparando com dados parasitológicos;
2. Avaliar os *kits* empregados para o diagnóstico da LVC (DPP e EIE-LVC) no grupo de cães estudados;
3. Avaliar o desempenho da PCR com alvo dirigido para a região do gene ribossomal (18S rDNA) em fragmentos de pele, visando o rastreamento de *T. caninum*;
4. Analisar, através do sequenciamento, os produtos amplificados com alvo 18S rDNA objetivando a identificação etiológica;
5. Avaliar o desempenho das ferramentas sorológicas e moleculares empregadas neste estudo, considerando a cultura como padrão de referência.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS/RESULTADOS**

A metodologia e os resultados obtidos neste estudo serão apresentados no formato de artigos científicos submetidos à publicação.

Nesta seção estão anexados 2 artigos:

- **Artigo 1: In-house assessment of ELISA for the diagnosis of *Trypanosoma caninum* infection in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil**
  
- **Artigo 2: *Trypanosoma caninum*: diagnostic evaluation of 18S rDNA PCR using skin fragments**

a. **Artigo 1**

---

Avaliação do ELISA *in-house* paradiagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma caninum* em cães domésticos no Rio de Janeiro, Brasil

Artigo submetido para publicação na revista Research in Veterinary Science

---

Este artigo apresenta e discute a aplicação do teste de ELISA, padronizado *in house* com antígenos homólogos (ELISA-Tc), em amostras de 229 cães como uma ferramenta para o diagnóstico da infecção por *Trypanosoma caninum*.

A partir dos resultados obtidos com este teste não foi possível detectar todos os casos de *T. caninum* parasitologicamente positivos, demonstrando uma acurácia moderada do ELISA-Tc para o diagnóstico de *T. caninum*. Já os testes de DPP e EIE-LVC, aplicados no mesmo grupo de animais, apresentaram índices de sensibilidade e especificidade elevados, confirmando a utilidade de ambos os testes no controle da LVC. Um dado importante encontrado em nosso estudo foi a verificação que não houve reatividade cruzada do DPP e do EIE-LVC em cães parasitologicamente positivos para *T. caninum*.

Os resultados deste artigo respondem aos objetivos específicos n° 1 e 2 e responde parcialmente ao objetivo específico n° 5 desta tese.

**Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science  
Manuscript Draft**

Manuscript Number:

Title: In-house assessment of ELISA for the diagnosis of Trypanosoma caninum infection in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil

Article Type: Research Paper

Section/Category: Parasitology

Keywords: Dog; Visceral Leishmaniasis; Diagnosis; Trypanosoma caninum

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

Corresponding Author's Institution: Fundação Oswaldo Cruz

First Author: Andressa Guimarães S Pinto, MsC

Order of Authors: Andressa Guimarães S Pinto, MsC; Helena K Toma, PhD; Eliame Mouta-Confort, PhD; Andreia S Alves, MsC; Fernanda N Santos, PhD; Fabiano B Figueiredo, PhD; Lilian D Nascimento, PhD; Maria de Fatima Madeira, Ph.D

Abstract: The objective of this study was to evaluate an ELISA assay (ELISA-Tc) for the diagnosis of Trypanosoma caninum in 229 dogs. Dual Path Platform (DPP®) test and immunoenzymatic assay (EIELVC) were also performed. Skin fragment culture was used as the reference test. At culture, T. caninum was isolated from 11 dogs and Leishmania chagasi from 12. Ninety dogs (39.3%) showed positive results to ELISA-Tc, including 8 that were culture-positive for T. caninum and 11 that were culturepositive for L. chagasi, indicating a sensitivity and specificity of 81.8% and 62.4%, respectively. DPP and EIE-LVC tests, yielding sensitivity indices of 91.7% and 100% and specificity of 99.1% and 96.8%, respectively. Our results confirm that T. caninum and L. chagasi coexist in dogs in Rio de Janeiro. Despite the low specificity of the ELISA-Tc, our results suggest that serological testing can still be useful for the diagnosis of natural infections by T. caninum.

Suggested Reviewers: Rodrigo C Menezes PhD research, Fundação Oswaldo Cruz  
rodrigo.menezes@ipecc.fiocruz.br  
expert in parasitology area

Mauro Marzochi PhD research, Fundação Oswaldo Cruz  
[mauro.marzochi@ipecc.fiocruz.br](mailto:mauro.marzochi@ipecc.fiocruz.br)

**Manuscript**[Click here to view linked References](#)

1 **In-house assessment of ELISA for the diagnosis of *Trypanosoma caninum* infection in**  
2 **domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil**

3

4 A.G.S. Pinto <sup>ab</sup>, H.K. Toma<sup>c</sup> E. Mouta-Confort<sup>b</sup>, A.S. Alves<sup>b</sup>, F.N. Santos<sup>d</sup>, F.B. Figueiredo<sup>e</sup>,  
5 L.D. Nascimento<sup>b</sup>, M.F. Madeira<sup>13,\*</sup>

6

7 <sup>a</sup> *Programa de pos-graduagdo em Pesquisa Clinica em Doengas Infeciosas, Institute de*  
8 *Pesquisa Clinica Evandro Chagas, Fundagdo Oswaldo Cruz, Av.Brasil 4365, 21040-900 Rio*  
9 *de Janeiro, RJ, Brasil*

10 <sup>b</sup> *Laboratdrio de Vigildncia em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clinica Evandro*  
11 *Chagas, Fundagdo Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

12 <sup>c</sup> *Laboratdrio de Diagnostico Molecular e Hematologia, Faculdade de Farmdcia,*  
13 *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373 Rio de Janeiro, RJ,*  
14 *Brasil*

15 <sup>d</sup> *^etor de Imunodiagndstico do Laboratdrio de Pesquisas e Servigos em Saude Publica,*  
16 *Departamento de Ciencias Bioldgicas, Escola Nacional de Saude Publica Sergio Arouca,*  
17 *Fundagdo Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

18 <sup>e</sup> *Laboratdrio de Pesquisa Clinica em Dermatozoonoses de Animais Domesticos, Instituto de*  
19 *Pesquisa Clinica Evandro Chagas, Fundagdo Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio*  
20 *de Janeiro, RJ, Brasil*

21

22 Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 9541

23 E-mail address: [fatima.madeira@ipec.fiocruz.br](mailto:fatima.madeira@ipec.fiocruz.br) (M.F. Madeira)



24 **ABSTRACT**

25 The objective of this study was to evaluate an ELISA assay (ELISA-Tc) for the diagnosis of  
26 *Trypanosoma caninum* in 229 dogs. Dual Path Platform (DPP®) test and immunoenzymatic  
27 assay (EIE-LVC) were also performed. Skin fragment culture was used as the reference test.  
28 At culture, *T. caninum* was isolated from 11 dogs and *Leishmania chagasi* from 12. Ninety  
29 dogs (39.3%) showed positive results to ELISA-Tc, including 8 that were culture-positive for  
30 *T. caninum* and 11 that were culture-positive for *L. chagasi*, indicating a sensitivity and  
31 specificity of 81.8% and 62.4%, respectively. DPP and EIE-LVC tests, yielding sensitivity  
32 indices of 91.7% and 100% and specificity of 99.1% and 96.8%, respectively. Our results  
33 confirm that *T. caninum* and *L. chagasi* coexist in dogs in Rio de Janeiro. Despite the low  
34 specificity of the ELISA-Tc, our results suggest that serological testing can still be useful for  
35 the diagnosis of natural infections by *T. caninum*.

36

37 *Keywords:* Dog, Visceral Leishmaniasis, Diagnosis, *Trypanosoma caninum*

## 38 **1. Introduction**

39 *Trypanosoma caninum* is a trypanosomatid agent described in the natural infection of  
40 domestic dogs, initially in the state of Rio de Janeiro (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010)  
41 and later in various other endemic regions of visceral leishmaniasis (Silva et al., 2011;  
42 Almeida et al., 2011; Barros et al., 2012). Being a recently described agent, criteria for its  
43 accurate diagnosis are yet to be established. With this in mind, Alves et al. (2012)  
44 standardized an ELISA test (ELISA-Tc) employing homologous antigens and verified that  
45 infection by *T. caninum* could be an additional confounding factor in the diagnosis of canine  
46 visceral leishmaniasis (CVL), especially in areas of overlap.

47 Currently, in Brazil, the Dual Path Platform (DPP®) rapid immunochromatographic test  
48 is used for triage with the immunoenzymatic (EIE-LVC) assay as a confirmatory test for the  
49 diagnosis of CVL. These tests are applied in sequence and the seropositive dogs are gathered  
50 and referred for euthanasia, following the recommendation of the Brazilian Ministry of Health  
51 (Ministerio da Saude, 2011).

52 Amongst the advantages of serological tests are speed, simplicity, practicality, and the use  
53 of noninvasive samples (Barroso-Freitas et al., 2009). However, one of the disadvantages of  
54 these tests is the possibility of cross-reactivity in areas of overlap. With regard to the  
55 diagnosis of CVL, this subject has been much discussed in the literature (Ramirez et al., 2002;  
56 Savani et al., 2005; Madeira et al., 2006; Madeira et al., 2009). The fact that *T. caninum* has  
57 been reported in numerous regions of Brazil (Barros et al., 2012) underlines the need to  
58 establish accurate tools for its diagnosis, particularly as it involves a potential reservoir of  
59 such an important public health zoonosis as visceral leishmaniasis.

60 The objective of this study was to evaluate the ELISA-Tc in a larger sample of animals in  
61 terms of parasitological data. In parallel, the cross-reactivity of *T. caninum* with the

62 commercial tests (DPP and EIE-LVC) used for the diagnosis and control of CVL was  
63 evaluated.

64

## 65 **2. Materials and methods**

### 66 *2.1. Animals*

67 Dogs were triaged during a serological survey for leishmaniasis in the region of Carapia,  
68 Guaratiba, western region of the Municipality of Rio de Janeiro (Figueiredo et al., 2010).  
69 While 305 dogs were evaluated, due to loss of samples, our study only included 229 dogs. For  
70 clinical examination and collection of samples, the dogs were mechanically contained and  
71 sedated with ketamine (10 mg/kg) combined with acepromazine (0.2 mg/kg). They were  
72 classified clinically as asymptomatic (no clinical signs), oligosymptomatic (1 to 3 clinical  
73 signs), and symptomatic (>3 clinical signs), applying the criteria proposed by Mancianti et al.  
74 (1988) and Abranches et al. (1991). Following the clinical exam, peripheral blood and tissue  
75 specimens (intact skin and cutaneous lesion) were collected for serological evaluation and  
76 parasite culture, respectively. Definitive diagnosis was established based on the isolation of *T.*  
77 *caninum* or *L. chagasi* in culture. The study was submitted and approved by the Commission  
78 on the Ethical Treatment of Animals (CEUA) of Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) under  
79 the license nº L-017/06.

80

### 81 *2.2. Diagnostic tests*

#### 82 *2.2.1. Culture*

83 The parasitological evaluation was performed using fragments of intact skin and cutaneous  
84 lesion, when present, from all dogs. Skin biopsies were performed after trichotomy and local  
85 anesthesia with lidocaine using a 3-mm punch. The fragments were placed in a tube  
86 containing saline solution with 1,000 U of penicillin, 200 mg of streptomycin, and 50 jig of 5-

87 fluorocytosine and stored for 24 h at 4°C. After this period, the fragments were cultured in  
88 tubes containing Novy, MacNeal, and Nicolle (NNN) culture media and 1.5 mL of Schneider  
89 medium (*Drosophila* medium-Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum. The  
90 cultures were made in duplicates, incubated at 26-28°C, and examined weekly for 40-50 days  
91 by fresh exam seeking evidence of flagellated forms. In cases where the parasite was isolated,  
92 the samples were replicated for the production of parasitic mass for posterior etiological  
93 characterization by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE; promastigote forms) or  
94 PCR/sequencing (epimastigote forms). For isoenzyme electrophoresis, we used 5 enzymatic  
95 systems: 6-phosphate dehydrogenase (6PGDH), phosphoglucose isomerase (GPI),  
96 nucleotidase (NH), phosphoglucomutase (PGM), and glucose-6-phosphate dehydrogenase  
97 (G6PDH), comparing the electrophoretic profiles of the isolated samples to the standard  
98 reference strains of *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) and *L. braziliensis*  
99 (MHOM/BR/1975/M2903) (Cupolillo et al., 1994). When epimastigote forms were isolated,  
100 identification of *T. caninum* was performed by PCR using the 18S rDNA gene, the products  
101 of which were sequenced afterwards (Barros et al., 2012).

102

### 103 2.2.2. Serological tests

104 Reactivity for the detection of serum IgG was evaluated in all dogs using 3 tests: ELISA-  
105 Tc with homologous antigens of *T. caninum* (Alves et al., 2012), EIE-LVC, (leishmaniose  
106 visceral canina), and DPP. The EIE-LVC and DPP kits are produced by Bio-  
107 Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, and distributed by the public network for the  
108 diagnosis of CVL.

109 For the ELISA-Tc tests, we used 100  $\mu$ L of a solution of *T. caninum* antigen (10  $\mu$ g/mL)  
110 diluted in 0.06 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) adsorbed in plates (Imuno Maxisorp;  
111 NUNC). The plates were incubated overnight at 4°C and then washed 4 times (PBS

112 containing 0.05% Tween 20). The serum samples were diluted 1:40 in a solution of 1%  
113 skimmed milk (PBS 0.01 M, containing 0.05% Tween 20) and the plates were incubated at  
114 37°C for 45 min. Anti-dog IgG peroxidase conjugate was added and the reaction was revealed  
115 using 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB). The optical density (OD) absorbance (405 nm)  
116 was measured using an ELISA reader (Genious-Tecan®). The results of the ELISA-Tc were  
117 presented in Arbitrary Units (AU) that corresponded to the ratio of the OD of the sample and  
118 the average of the ODs of the negative controls plus twice the standard deviation (SD).  
119 Positive results were defined as AU values >1. The performance of the tests was evaluated  
120 using MedCalc 11.6.0.0 software. The EIE-LVC and the DPP were conducted as directed by  
121 the manufacturer with the cut-off values for the EIE-LVC test defined as 2 times the average  
122 of the ODs of the negative controls.

123

### 124 **3. Results**

125 Of the 229 dogs, 213 (93%) were asymptomatic, 15 (6.5%) oligosymptomatic, and 1  
126 (0.44%) symptomatic for CVL. *L. chagasi* was isolated from 12 dogs (5.2%) from intact skin  
127 fragments (n = 8) or cutaneous lesion (n = 4). *T. caninum* was isolated exclusively from intact  
128 skin samples of 11 dogs (4.8%).

129 In the assays for anti-*T. caninum* antibodies (ELISA-Tc), 90 (39.3%) dogs were  
130 seropositive. Of these, 71 (78.8%) were parasite culture-negative, while *T. caninum* was  
131 isolated from 8 (8.8%) and *L. chagasi* was isolated from 11 (12.2%).

132 For the commercial CVL diagnostic tests, the DPP yielded positive results in 13 (5.7%)  
133 dogs. *L. chagasi* was isolated from 11 of these dogs, while 2 were culture-negative. As to the  
134 EIE-LVC assay, 19 (8.3%) dogs were seropositive, including 12 dogs showing isolation of *L.*  
135 *chagasi* and 7 parasitologically negative dogs (Table 1). Sensitivity and specificity values for  
136 the tests are shown in Table 2.

#### 137 **4. Discussion**

138 Our study has once again demonstrated the overlap of the geographical distributions of *T.*  
139 *caninum* and *L. chagasi*. Despite concern that this overlap can be a further confounding factor  
140 in the diagnosis of CVL, in our study, we did not observe cross-reactivity of dogs infected  
141 with *T. caninum* in the DPP or EIE-LVC tests. This result differs from those of other authors,  
142 who have reported that *T. caninum* infection can cause cross-reactivity of these tests. Our  
143 results showed good specificity of both of the tests used by the public network for CVL  
144 diagnosis.

145 Clinical data about *T. caninum* infections remains scarce. However, results reported to date  
146 have indicated that the infection can progress asymptotically with a low humoral immune  
147 response (Madeira et al., 2014). The results obtained in the present study corroborate this  
148 hypothesis, given that of 11 infected dogs, only one presented as oligosymptomatic. Previous  
149 studies have also shown that a majority of dogs naturally infected with *T. caninum* present as  
150 asymptomatic (Pinto et al., 2010; Almeida et al., 2011; Barros et al., 2012). In contrast, *L.*  
151 *chagasi* infection presents with fairly common clinical signs that vary with the disease stage  
152 (Marzochi et al., 1985; Miro et al., 2008; Paradies et al., 2010). However, of the 12 dogs that  
153 had positive *L. chagasi* cultures in the present study, only one showed classic symptoms of  
154 CVL. This finding reinforces that for the purpose of infection control, clinical data alone  
155 should not be considered adequate for the diagnosis of *L. chagasi* infection.

156 In our study, all of the dogs (100%) with positive *L. chagasi* cultures exhibited EIE-LVC  
157 seropositivity, although one of them had a negative DPP result. This finding is important  
158 considering the test sequence recommended by the Ministry of Health (DPP followed by EIE-  
159 LVC). This animal, in which *L. chagasi* was isolated from cutaneous lesion but not from  
160 intact skin, would not have been collected and would have remained in the area. Studies have  
161 shown that parasitic density is higher in the skin in symptomatic cases. This suggests that this

162 dog may have been in an initial stage of the disease (Reis et al., 2006), thus explaining the  
163 negative DPP result that is commonly seen in asymptomatic cases (Grimaldi et al., 2012). On  
164 the other hand, two dogs with negative parasite cultures had positive DPP tests, and one of  
165 these also had a positive ELISA-Tc test. A limitation of the sensitivity of the cultures might  
166 explain this finding.

167 The ELISA-Tc results indicated a *T. caninum* infection prevalence of 39.3% in the group  
168 assessed. However, the test was not able to detect all of the cases that were confirmed by  
169 culture, indicating that serology alone should not be used. On the other hand, 91% of dogs  
170 infected with *L. chagasi* showed seropositivity on the ELISA-Tc. The humoral immune  
171 response is exacerbated in CVL, which may have facilitated this cross-reactivity.

172 Culture results indicated a similar prevalence of *T. caninum* infection to those reported in  
173 previous studies (Pinto et al., 2010; Almeida et al., 2011). However, a higher prevalence was  
174 indicated by the ELISA-Tc results. This demonstrates the potential limitations of culture  
175 methods and suggests that approximately 40% of the assessed dogs had been sensitized by  
176 possible contact with *T. caninum*.

177 Currently, there are no serological methods that have been developed specifically for the  
178 diagnosis of *T. caninum*. Despite the ELISA-Tc employing homologous antigens, it  
179 demonstrated moderate accuracy, indicating that the sensitivity and specificity parameters of  
180 this test should be improved, and, in this context, the use of more sensitive tools such as PCR  
181 can be an important alternative for the study of *T. caninum*.

182

### 183 **Acknowledgements**

184 This study is part of the doctoral thesis of Andressa Guimaraes de Souza Pinto at the  
185 Clinical Research of Infectious Diseases Program of the Evandro Chagas Institute, Oswaldo  
186 Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. The present study was partially financed by the

187 National Council of Research Development (CNPq - Program PAPES VI, process  
188 407700/2012-9) and Research Support Foundation of Rio de Janeiro State (FAPERJ -  
189 Program Young Scientist from our state). MF Madeira and FB Figueiredo hold a grant for  
190 productivity in research.

191

## 192 **References**

193 Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Concei9ao-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G.,

194 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission  
195 of infection. *The Journal of Parasitology* 77, 557-561.

196 Almeida, A.B.P.F., Sousa, V.R.F., Boa Sorte, E.C., Figueiredo, F.B., Paula, D.A.J., Pimentel,

197 M.F., Dutra, V., Madeira, M.F., 2011. Use of parasitological culture to detect *Leishmania*  
198 (*Leishmania*) *chagasi* in naturally infected dogs. *Vector-borne and Zoonotic Disease* 11,  
199 1555-1560.

200 Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A.O., Madeira,

201 M.F., 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral  
202 leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Research in Veterinary*  
203 *Science* 93, 1329-1333.

204 Barros, J.H.S., Almeida, A.B.P.F., Figueiredo, F.B., Sousa, V.R.F., Fagundes, A., Pinto,

205 A.G.S., Baptista, C., Madeira, M.F., 2012. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas  
206 overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis  
207 control? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106, 419-  
208 423.

209 Barroso-Freitas, A.P.T., Passos, S.R.L., Mouta-Confort, E., Madeira M.F., Schubach, A.O.,

210 Santos, G.P.L., Nascimento, L.D., Marzochi, M.C.A., Marzochi, K.B.F., 2009. Accuracy  
211 of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of american



212 tegumentary leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and  
213 Hygiene 103, 383-389.'

214 Cupolillo, E., Grimaldi, G.Jr., Momen, H., 1994. A general classification of New World  
215 *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. American Journal of Tropical Medicine and  
216 Hygiene 50, 296-311.

217 Figueiredo, F.B., Madeira, M.F., Nascimento, L.D., Abrantes, T.R., Mouta-confort, E.,  
218 Passos, S.R.L., Schubach, T.M.P., 2010. Canine visceral leishmaniasis: study of methods  
219 for the detection of IgG in serum and eluate samples. Revista do Instituto de Medicina  
220 Tropical de Sao Paulo 52, 193-196.

221 Grimaldi, G.Jr., Teva, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.B., Pinto, I.S., de-Azevedo, C.T.,  
222 Falqueto, A., 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-  
223 Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral  
224 leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 106,  
225 54-59.

226 Madeira, M.F., Schubach, A., Schubach, T.M., Pacheco, R.S., Oliveira, F.S., Pereira, A.S.,  
227 Figueiredo, F.B., Baptista, C., Marzochi, M.C.A., 2006. Mixed infection with *Leishmania*  
228 (*Viannia braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog  
229 from Rio de Janeiro, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and  
230 Hygiene 100, 442-445.

231 Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach, A., de  
232 Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M.C.A., 2009.  
233 *Trypanosoma caninum n. sp.* (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a  
234 domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology 136, 411-  
235 423.

- 236 Madeira, M.F, Almeida, A.B.P.F., Barros, J.H., Oliveira, T.S.F., Sousa, V.R.F., Alves, A.S.,  
237 Miranda, L.F.C., Schubach, A.O., Marzochi, M.C.A., 2014. *Trypanosoma caninum*, a new  
238 parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. The Journal of  
239 Parasitology, *In Press*.
- 240 Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis  
241 control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following  
242 antimonial treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene  
243 82, 566-567.
- 244 Marzochi, M.C.A., Coutinho, S.G., Souza, W.J.S., Toledo, L.M., Grimaldi, G.Jr., Momen, H.,  
245 Pacheco, R.S., Sabroza, P.C., De Souza, M.A., Rangel Junior, F.B., Tramontano, N.C.,  
246 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological,  
247 therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Memorias do Instituto Oswaldo  
248 Cruz 80, 349-357.
- 249 Ministerio da Saude. Nota tecnica conjunta n<sup>o</sup> 01/2011 - CGDT/DEVIT/SUS/MS.  
250 Esclarecimento sobre a substituiçao do protocolo diagnostico de leishmaniose visceral  
251 canina (LVC). Brasilia, DF.
- 252 Miro, G.,Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G. , 2008. Canine leishmaniosis - new  
253 concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends in Parasitology 24, 371-  
254 377.
- 255 Paradies, P., Sasanelli, M., Capraii, D., Testini, G., Traversa, D., Lia, R.P., Dantas-Torres, F.,  
256 Otranto, D., 2010. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by  
257 *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal* 186, 370-373.
- 258 Pinto, A.G.S., Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Barros, J.H.S., de Paula,  
259 C.C., Toma, H.K., Madeira, M.F., 2010. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic  
260 dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 137, 1653-1660.

- 261 Ramirez, L.E., Lages-Silva, E., Alvarenga-Franco, F., Matos, A., Vargas, N., Fernandes, O.,  
262 Zingales, B., 2002. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in  
263 opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil.  
264 *Acta Tropica* 84, 189-198.
- 265 Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W.,  
266 Fran9a-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., 2006. Parasite  
267 density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical  
268 aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 81, 68-75.
- 269 Savani, E.S., Nunes, V.L., Galati, E.A., Castilho, T.M., Araujo, F.S., Ilha, I.M., Camargo,  
270 M.C., D'Auria, S.R., Floeter-Winter, L.M., 2005. Ocurrence of co-infection by *Leishmania*  
271 (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma (Trypanosoon) evansi* in a dog in the state of  
272 Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 739-741.
- 273 Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., Souza, C.M., Figueiredo, F.B., 2011. Laboratory  
274 tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control  
275 program. *Veterinary Parasitology* 179, 257-261.

Table 14

**Table 1**

Results of parasitological diagnosis (culture) and serological tests (ELISA-Tc, EIE-LVC, and DPP) obtained from 229 dogs in Rio de Janeiro, Brazil.

Group of dogs studied (N=229)	Serological data N(%)		
	ELISA-Tc	EIE-LVC	DPP
Dogs with isolation of <i>T. caninum</i> (n=11; 4,8%)	72,72 % (n=8)	0%	0%
Dogs with isolation of <i>L. chagasi</i> (n=12; 5,2%)	91,66% (n=11)	100% (n=12)	91,66% (n=11)
Culture negative dogs (n=206; 90%)	34,46% (n=71)	3,4% (n=7)	1% (n=2)

EIE-LCV - Leishmaniose visceral canina kit, Bio-Manguinhos/Fiocruz; ELISA-Tc - *T. caninum* antigen in house test; DPP- immunochromatographic test.

Table 15

**Table 2**

Sensitivity and specificity of ELISA-Tc, EIE-LVC, and DPP tests, considering the culture as the reference test performed in 229 dogs from Rio de Janeiro, Brazil.

<b>Tests</b>	<b>Sensitivity Specificity</b>	
ELISA-Tc	81.82% (CI%: 48.22 - 97.72)	62.39% (CI%: 48.22 - 97.72)
DPP	91,67% (CI%: 61.52 - 99,79)	99,08% (CI%: 96.71 - 99.89)
EIE-LVC	100% (CI%: 73.54 - 100)	96,77% (CI%: 93.47 - 98.69)

EIE-LCV - Leishmaniose visceral canina kit, Bio-Manguinhos/Fiocruz; ELISA-Tc - *T.caninum* antigen in house test; DPP- immunochromatographic test; CI - Confidence Interval.

## 4.2. Artigo 2

---

*Trypanosoma caninum*: avaliação diagnóstica da PCR 18SrDNA utilizando fragmentos de pele

Artigo submetido para publicação na revista Veterinary Parasitology

---

Apesar de *T. caninum* ser uma espécie recentemente conhecida, 53 casos da infecção natural em cães já foram registrados em áreas onde a leishmaniose visceral (LV) é endêmica. Nesse contexto, é importante mencionar que o cão doméstico (*Canis familiaris*) constitui um importante alvo nas ações de controle da LV e, que ferramentas acuradas para o diagnóstico desse agente ainda não foram plenamente estabelecidas. Neste artigo, objetivamos avaliar ensaios baseados na PCR, visando o diagnóstico e rastreamento molecular de *T. caninum* em amostras de pele coletada de 229 cães, oriundos de área endêmica de leishmaniose visceral canina.

Os resultados apresentados nesse artigo são pioneiros, já que foi a primeira vez que a rastreabilidade da infecção por *T. caninum*, usando uma ferramenta molecular, foi utilizada. De um modo geral, demonstramos que o diagnóstico acurado da infecção por *T. caninum* não pode ser dado ainda, por uma única ferramenta. Apesar disso, a PCR-18S rDNA foi útil para o rastreamento molecular de *T. caninum*, acrescentando dados para o conhecimento da sua prevalência em cães no Rio de Janeiro.

Os resultados deste artigo respondem aos objetivos específicos nº 3 e 4 e responde parcialmente ao objetivo específico nº 5 desta tese.

**Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science  
Manuscript Draft**

Manuscript Number:

Title: *Trypanosoma caninum*: diagnostic evaluation of 18S rDNA PCR using skin fragments

Article Type: Research Paper

Keywords: *Trypanosoma caninum*; Dog; Leishmaniasis; PCR

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

Corresponding Author's Institution: Fundafao Oswaldo Cruz

First Author: Andressa Guimaraes S Pinto, MsC

Order of Authors: Andressa Guimaraes S Pinto, MsC; Helena K Toma, PhD; Fabiano B Figueiredo, PhD; Maria de Fatima Madeira, Ph.D

**Abstract:** The genus *Trypanosoma* includes agents responsible for numerous diseases important in human and veterinary medicine. A new species, *Trypanosoma caninum*, was recently described in Brazil, which infects domestic dogs. Improved tools for the diagnosis of *T. caninum* have not yet been established, and distinguishing between *T. caninum* and *Leishmania chagasi* is challenging, because both agents infect domestic dogs and are found on the skin of those animals. Our aim in this study was to evaluate PCR-based tests for the molecular screening of *T. caninum* in dogs from areas endemic for canine visceral leishmaniasis. Assays were based on the amplification and sequencing of a partial sequence from the small subunit ribosomal gene (18S rDNA) and from the kDNA minicircles region, which is specific for the genus *Leishmania*. Current results were compared with previously obtained laboratory data (skin culture). *T. caninum* and *L. chagasi* were isolated from 11 and 12 dogs, respectively. We observed a positivity rate of 15.28% (n=35) when 18S rDNA PCR was used. Among these, 25 dogs showed an amplification pattern similar to that in *T. caninum*, whereas those from 10 dogs showed a pattern similar to that in *L. chagasi*. These results were confirmed by sequencing. Results of kDNA PCR showed that 14 dogs were positive (12 with isolation of *L. chagasi*, and two additional dogs with negative culture and PCR results). Our results demonstrate that 18S rDNA PCR should be used together with other methods for the diagnosis of *T. caninum*. However, these results also indicate that 18S rDNA PCR is useful for the molecular screening of *T. caninum*, particularly in areas where an overlap between *T. caninum* and *L. chagasi*.

**\*Manuscript**[Click here to view linked References](#)

1 **Trypanosoma caninum:** diagnostic evaluation of 18S rDNA PCR using skin

2 fragments

3 A.G.S. Pinto <sup>ab</sup>, H.K. Toma<sup>c</sup>, F.B. Figueiredo<sup>d</sup>, M.F. Madeira<sup>13,\*</sup>

4

5 <sup>a</sup> Programa de pos-graduagdo em Pesquisa Clinica em Doengas Infecciosas, Instituto

6 de Pesquisa Clinica Evandro Chagas, Fundagdo Oswaldo Cruz, Av.Brasil 4365, 21040-

7 900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

8 <sup>b</sup> Laboratorio de Vigildncia em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clinica Evandro

9 Chagas, Fundagdo Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ,

10 Brasil

11 <sup>c</sup> Laboratorio de Diagnostico Molecular e Hematologia, Faculdade de Farmdcia,

12 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373 Rio de Janeiro,

13 RJ, Brasil

14 <sup>d</sup> Laboratorio de Pesquisa Clinica em Dermatozoonoses de Animais Domesticos,

15 Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas, Fundagdo Oswaldo Cruz, Av. Brasil

16 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

17

18 \*Corresponding author at: Laboratorio de Vigilancia em Leishmanioses, Instituto de

19 Pesquisa Clinica Evandro Chagas, Funda9ao Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-

20 900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel.: +55 21 3865 9541.

21

*E-mail address: fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br (M.F. Madeira).*



## 24 ABSTRACT

25 The genus *Trypanosoma* includes agents responsible for numerous diseases important in  
26 human and veterinary medicine. A new species, *Trypanosoma caninum*, was recently  
27 described in Brazil, which infects domestic dogs. Improved tools for the diagnosis of *T.*  
28 *caninum* have not yet been established, and distinguishing between *T. caninum* and  
29 *Leishmania chagasi* is challenging, because both agents infect domestic dogs and are  
30 found on the skin of those animals. Our aim in this study was to evaluate PCR-based  
31 tests for the molecular screening of *T. caninum* in dogs from areas endemic for canine  
32 visceral leishmaniasis. Assays were based on the amplification and sequencing of a  
33 partial sequence from the small subunit ribosomal gene (18S rDNA) and from the  
34 kDNA minicircles region, which is specific for the genus *Leishmania*. Current results  
35 were compared with previously obtained laboratory data (skin culture). *T. caninum* and  
36 *L. chagasi* were isolated from 11 and 12 dogs, respectively. We observed a positivity  
37 rate of 15.28% (n=35) when 18S rDNA PCR was used. Among these, 25 dogs showed  
38 an amplification pattern similar to that in *T. caninum*, whereas those from 10 dogs  
39 showed a pattern similar to that in *L. chagasi*. These results were confirmed by  
40 sequencing. Results of kDNA PCR showed that 14 dogs were positive (12 with  
41 isolation of *L. chagasi*, and two additional dogs with negative culture and PCR results).  
42 Our results demonstrate that 18S rDNA PCR should be used together with other  
43 methods for the diagnosis of *T. caninum*. However, these results also indicate that 18S  
44 rDNA PCR is useful for the molecular screening of *T. caninum*, particularly in areas  
45 where an overlap between *T. caninum* and *L. chagasi*.

47 1. Introduction

48 Trypanosoma caninum was initially described in a dog co-infected with Leishmania  
49 braziliensis, in the municipality of Rio de Janeiro (Madeira et al., 2009). Subsequently,  
50 it was described in other regions of that municipality (Pinto et al., 2010; Silva et al.,  
51 2011) and in other Brazilian States (Almeida et al., 2011; Barros et al., 2012). Despite  
52 attempts to isolate the pathogen from blood and tissue samples, all 53 isolates of T.  
53 caninum described to date (Barros et al., 2012) were obtained from culture of intact skin  
54 from dogs, which suggests the skin as a target for molecular screening of T. caninum.  
55 Although epidemiological aspects are still unknown, the presence of T. caninum in  
56 areas of canine visceral leishmaniasis (CVL) has been regarded as a possible  
57 confounding factor in the control of CVL, since serological cross-reactivity is a  
58 common occurrence in areas where different trypanosomatids circulate. Previous studies  
59 demonstrated that dogs infected by T. caninum and seropositive for Leishmania sp.  
60 were euthanized, in agreement with the control measures for CVL established in Brazil  
61 (Ministerio da Saude, 2006). However, infection by Leishmania chagasi was not  
62 confirmed in those animals (Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011), and thus diagnostic  
63 methods with higher specificity and that can safely distinguish infection caused by  
64 Leishmania sp. from T. caninum are needed, especially in areas where the two overlap.  
65 Polymerase chain reaction (PCR) is a methodology used in many diagnostic areas, in  
66 particular due to its sensitivity and specificity (Alves and Bevilacqua, 2004).

67 Additionally, PCR can be performed using different clinical specimens, and according  
68 to the molecular target, also allows etiological identification (Tavares et al., 2003;  
69 Solano-Gallego et al., 2007; Manna et al., 2008). Parasites from the family  
70 Trypanosomatidae are extremely complex and exhibit a wide genetic diversity, and  
71 hence, efforts have been focused on improving more ubiquitous PCR-based protocols

72 (Souto et al., 1999; Noyes et al., 1999; Hamilton et al., 2004; Smith et al., 2008).  
73 Species-specific and/or generic targets, which potentially recognize all *Trypanosoma*  
74 spp., have been studied. Analyses are based not only on the size of the amplification  
75 products by PCR, but also on the nucleotide sequence of the products. The 18S  
76 ribosomal DNA gene, a generic target, has been broadly studied in different species of  
77 trypanosomatids (Noyes et al., 1999; Deborggraeve et al., 2008; Smith et al., 2008).  
78 *T. caninum* is found in various CVL endemic regions in Brazil, but the most  
79 registered cases are in the municipality of Rio de Janeiro (Barros et al., 2012). Lack of  
80 data regarding prevalence rates of *T. caninum* together with the absence of  
81 epidemiological surveys of canine trypanosomiasis in Rio de Janeiro highlights the need  
82 for a specific and sensitive tool to distinguish infections caused by *Leishmania* sp. from  
83 those caused by *T. caninum*. Therefore, our aim in this study was to assess PCR-based  
84 tools targeting the 18S rDNA gene for screening infection caused by *T. caninum* in  
85 domestic dogs in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil.

86

## 87 2. Materials and methods

### 88 2.1. Dogs

89 The animals in this study were selected during a serological survey for leishmaniasis  
90 performed in the municipality of Rio de Janeiro, and included 229 domestic dogs older  
91 than six months, and of both genders (Figueiredo et al., 2010). These dogs were  
92 mechanically contained, sedated with ketamine (10 mg/kg) and acepromazine (0.2  
93 mg/kg), and clinically evaluated. After trichotomy, antisepsis, and local anesthesia  
94 (lidocaine), fragments (3 mm) of intact skin from the scapular region were collected by  
95 biopsy, and stored at -20°C until analyzed. This study was approved by the Ethics  
96 Committee on Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (number L-017/06).

## 97 2.2. Molecular assays

98 Skin samples were evaluated by three different PCR assays: a) targeting a partial  
99 sequence from the small subunit ribosomal gene (18S rDNA-SSU); b) targeting a  
100 conserved region of kDNA minicircles for *Leishmania* sp.; and c) targeting a  
101 constitutive gene as an internal control. DNA was extracted from skin fragments of  
102 approximately 10-25 jig using the Wisard® Genomic DNA Purification Kit (Promega,  
103 USA). DNA was quantified by spectrophotometry (Eppendorf Biophotometer), and the  
104 DNA extraction yield and purity were measured in absorbance (260/280 nm ratio).

105 For the assay targeting the 18S rDNA, PCR sensitivity was initially determined using  
106 DNA of *T. caninum* extracted from culture, and DNA extracted from skin fragments  
107 collected from three dogs from which *T. caninum* was isolated. To obtain DNA from  
108 the epimastigote stages, approximately 10 mL of culture in log phase was used (stock  
109 A27; Madeira et al., 2009). The extraction was performed using DNAzol (Invitrogen,  
110 Carlsbad, CA, USA) and quantification by serial dilutions (1:10 to 1:10,000,000) in  
111 triplicates. The sensitivity of the target corresponded to the last concentration (in ng) in  
112 which visualization of diagnostic bands was possible. Thus, the detection limit for *T.*  
113 *caninum* DNA in skin samples was established.

114 For the 18S rDNA assays, nested PCR was used with the external primers  
115 TRY927-F (5'-GAAACAAGAAACACGGGAG-3')/TRY927-R (5'-  
116 CTACTGGGCAGCTTGGA-3') and the internal primers SSU561-F (5'-  
117 TGGGATAACAAAGGAGCA-3')/SSU561-R (5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-  
118 3'), following the protocol by Smith et al. (2008), taking into account the limit of  
119 detection for *T. caninum* DNA. Reproducibility testing of the PCR targeting 18S rDNA  
120 was performed randomly with 52 skin samples.

121 The amplification products obtained in the second PCR round were purified using  
122 the QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the  
123 manufacturer's instructions, and the nucleotide sequences processed in an automated  
124 sequencer (3730 DNA Analyzer; Applied Biosystems), edited using Bioedit software,  
125 and analyzed by Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

126 For PCR assays specifically targeting *Leishmania* sp., we considered the results  
127 obtained in the 18S rDNA and the culture results, and thus processed only positive  
128 samples. This assay was conducted as described by Degraeve et al. (1994), using the  
129 primers 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' and 5'-  
130 GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3'.

131 For the internal control, the target was a segment of a constitutive gene, coding for  
132 the beta-globin protein subunit. Primers flanking a sequence of 118 bp were used: 5'-  
133 CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' and 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3',  
134 based on protocols described by Quaresma et al. (2009).

135 Positive controls for *T. caninum* (DNA extracted from culture and skin fragments)  
136 and for *L. chagasi* (DNA from culture) were used in all assays, in addition to negative  
137 controls (in which all reaction components were added with the exception of DNA). The  
138 amplification products of all assays were analyzed by electrophoresis using a 2.5%  
139 agarose gel (Invitrogen), with running conditions of 80 V for approximately 2 h. The  
140 DNA marker, 100 Base-Pair DNA Ladder (Amersham Pharmacia) was used. The gel  
141 was stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide (Invitrogen), visualized under ultraviolet  
142 light, and the image captured using a LPIX apparatus (Loccus Biotecnologia). Analysis  
143 of the PCR assays took into account results from cultures performed with skin  
144 fragments from the same site obtained previously (data in phase of publication).

### 146 3. Results

147 The concentration of DNA extracted from of *T. caninum* culture averaged 205  
148 ng/µL, and 18S rDNA target sensitivity corresponded to a dilution of 1:100,000,  
149 containing 0.00205 ng DNA. However, in tissue samples we observed much lower  
150 values, as expected, with no significant variations, averaging 60 ng/µL. Target  
151 sensitivity for tissue samples was 6 ng, corresponding to a dilution of 1:10. Considering  
152 this result and for standardization of the assays, a DNA concentration of 20 ng was  
153 used.

154

#### 155 3.1. PCR Assays

156 From the 229 skin samples processed and analyzed using 18S rDNA, 35 were  
157 positive, and among these, 25 showed an amplification pattern similar to the *T. caninum*  
158 control sample with a product of approximately 700 bp in the second round of nested  
159 PCR. Ten samples presented an amplification pattern similar to the *L. chagasi* control  
160 sample with an amplification product of 600 bp. The amplification pattern of *T.*  
161 *caninum* and *L. chagasi* is shown in Figure 1.

162 From the 25 dogs that were PCR-positive with the *T. caninum* pattern, among these  
163 *T. caninum* was isolated from 11 dogs upon culture. Although 10 dogs showed an  
164 amplification pattern similar to *Leishmania* sp. (~600 bp), infection caused by *L.*  
165 *chagasi* was confirmed in 14 animals, by specific PCR (kDNA) and culture, followed  
166 by isoenzyme electrophoresis in 12 dogs.

167 Analysis of the nucleotide sequence obtained from the 18S rDNA amplification  
168 product confirmed the result shown by the PCR amplification pattern. From the 35  
169 samples, 25 were identified as *T. caninum* and 10 were identified as *L. chagasi*. The  
170 results obtained using different approaches are summarized in Table 1.

171 The 18S rDNA assay was reproducible in the 52 samples tested, and the internal  
172 PCR control (beta-globin) gave amplification products of 118 bp in all tested samples.

173

#### 174 4. Discussion

175 *T. caninum* is an agent with specific characteristics that distinguish it from other  
176 parasites belonging to the genus *Trypanosoma*, such as its exclusive isolation from  
177 intact skin. To date the most appropriate biological sample or method for diagnosis of  
178 this pathogen has not been established. Although cultures have been used for diagnosis  
179 (Almeida et al., 2011), in our study, the pathogen was isolated only from 11 out of the  
180 25 dogs that tested positive for *T. caninum* infection using PCR. These results  
181 demonstrate the superiority of PCR compared to culture, as shown in other studies  
182 involving trypanosomatids (Fraga et al., 2010; Satow et al., 2013).

183 PCR is an important resource for diagnosis (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001;  
184 Strauss-Ayali et al., 2004), and a key advantage is its versatility regarding clinical  
185 samples (Tavares et al., 2003; Solano-Gallego et al., 2007; Manna et al., 2008; Leite et  
186 al., 2010). We chose to sample the skin because it represents the only site of *T. caninum*  
187 isolation used to date (Madeira et al., 2014). It is interesting to note that all skin samples  
188 obtained from dogs where *T. caninum* was isolated, were also positive for the 18S  
189 rDNA PCR, supporting our results. Another important observation was the fact that no  
190 inhibition occurred in any of the analyzed samples.

191 The 18S rDNA PCR showed that 10 dogs (eight with isolation of *L. chagasi* and two  
192 negative in culture) were also positive, with an amplification pattern similar to that from  
193 *L. chagasi*. This result was confirmed by sequencing the amplified products. However,  
194 when skin samples were analyzed using the specific target for the *Leishmania* sp., 12  
195 dogs where *L. chagasi* was isolated were identified. The large number of copies of

196 minicircles molecules present in the kinetoplast may explain these results (Reale et al.,  
197 1999; Lachaud et al., 2002), and this is a specific target when compared to 18S rDNA.  
198 Although differences in the amplification pattern between *Leishmania* sp. and *T.*  
199 *caninum* were evident by 18S rDNA, sequencing was necessary to confirm the results.  
200 Results from many studies have cautioned about the possibility that dogs infected by  
201 *T. caninum*, in areas where overlap occurs, may show cross-reactions in tests used for  
202 the diagnosis of CVL (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010; Alves et al., 2012). When  
203 we evaluated the serological response in this study, we observed that the presence of *T.*  
204 *caninum* does not hamper the control of CVL (data in phase of publication). However,  
205 comparison of the serological results with PCR, and considering the same group of  
206 animals, we observed that from the 25 animals identified by PCR, only 16 (64%) were  
207 seropositive. On the other hand, 66 animals that were seropositive were PCR-negative.  
208 These results may be explained by the characteristics of both tests, whose results may  
209 vary according to parasite load and phase of infection (Araujo et al., 2002), which are  
210 still unknown for *T. caninum*. Additionally, these data demonstrate that the accurate  
211 diagnosis of *T. caninum* infection cannot be accomplished using just one tool, whether it  
212 is parasitological, serological, or molecular.  
213 Comparison of the current results to those from previous studies led us to conclude  
214 that the 18S rDNA PCR may be an important diagnostic tool, particularly in regions of  
215 overlap between the two pathogens, because it provides a distinction between the two  
216 infections.  
217 Presently, PCR is not considered as a expensive method as it was previously, and  
218 considering the work load generated by culturing, molecular studies on specific targets  
219 should be encouraged, not only for the diagnosis of *T. caninum* infections, but also for  
220 screening, particularly in regions where *T. caninum* has not yet been described.



221 Acknowledgements

222 *We would like to thank Dr. Aline Fagundes of the Leishmaniasis Surveillance*

223 *Laboratory for supporting PCR tests.*

224 *This study is part of the doctoral thesis of Andressa Guimaraes de Souza Pinto at the*

225 *Clinical Research of Infectious Diseases Program of the Evandro Chagas Institute,*

226 *Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. The present study was partially*

227 *financed by the National Council of Research Development (CNPq - Program PAPES*

228 *VI, process 407700/2012-9) and Research Support Foundation of Rio de Janeiro State*

229 *(FAPERJ - Program Young Scientist from our state). MF Madeira and FB Figueiredo*

230 *hold a grant for productivity in research.*

## 231 References

- 232 Almeida, A.B.P.F., Sousa, V.R.F., Boa Sorte, E.C., Figueiredo, F.B., Paula, D.A.J.,  
233 Pimentel, M.F., Dutra, V., Madeira, M.F., 2011. Use of parasitological culture to  
234 detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne*  
235 *Zoonotic. Dis.* 11, 1555-1560.
- 236 Alves, W.A., Bevilacqua, P.D., 2004. Quality of diagnosis of canine visceral  
237 leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas  
238 Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saude Publica* 20, 259-265.
- 239 Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V.C., Schubach, A.O.,  
240 Madeira, M.F., 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine  
241 visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res. Vet.*  
242 *Sci.* 93, 1329-1333.
- 243 Araujo, F.M.G., Bahia, M.T., Magalhaes, N.M., Martins-Filho, O.A., Veloso, V.M.,  
244 Carneiro, C.M., Tafuri, W.L., Lana, M., 2002. Follow-up of experimental chronic  
245 Chagas disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with  
246 parasitological and serological methods. *Acta Trop.* 81, 21-31.
- 247 Barros, J.H.S., Almeida, A.B.P.F., Figueiredo, F.B., Sousa, V.R.F., Fagundes, A., Pinto,  
248 A.G.S., Baptista, C., Madeira, M.F., 2012. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in  
249 areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine  
250 leishmaniasis control? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 419-423.
- 251 Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopez U., 1994. Use of  
252 molecular probes and detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem.*  
253 *Inst. Oswaldo Cruz.* 89, 463-69.
- 254 Deborggraeve, S., Koffi, M., Jamonneau, V., Bonsu, F.A., Queyson, R., Simarro, P.P.,  
255 Herdewijn, P., Buscher P., 2008. Molecular analysis of archived blood slides

256 reveals an atypical human *Trypanosoma* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*  
257 61, 428-433.

258 Figueiredo, F.B., Madeira, M.F., Nascimento, L.D., Abrantes, T.R., Mouta-confort, E.,  
259 Passos, S.R.L., Schubach, T.M.P., 2010. Canine visceral leishmaniasis: study of  
260 methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Rev. Inst. Med. Trop.*  
261 *Sao Paulo* 52, 193-196.

262 Fraga, TL, Brustoloni, YM, Lima, RB, Dorval, ME, Oshiro, ET, Oliveira, J, Oliveira,  
263 AL, Pirmez, C., 2010. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for  
264 the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105,  
265 310-313.

266 Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J, Gibson, W.C., 2004.  
267 *Trypanosomes* are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde  
268 phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int. J. Parasitol.* 34,  
269 1393-1404.

270 Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien,  
271 P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of  
272 canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210-215.

273 Leite, R.S., Ferreira, S.A., Ituassu, L.T., Melo, M.N., Andrade, A.S.R., 2010. PCR  
274 diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab  
275 samples. *Vet. Parasitol.* 170, 201-206.

276 Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach,  
277 A., de Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M.C.A.,  
278 2009. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact  
279 skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil.  
280 *Parasitol.* 136, 411-423.

- 281 *Madeira, M.F, Almeida, A.B.P.F., Barros, J.H., Oliveira, T.S.F., Sousa, V.R.F., Alves,*  
282 *A.S., Miranda, L.F.C., Schubach, A.O., Marzochi, M.C.A., 2014. Trypanosoma*  
283 *caninum, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. J.*  
284 *Parasitol. In Press.*
- 285 *Manna, L., Reale, S., Picillo E., Vitale, F., Gravino, A.E., 2008. Urine sampling for*  
286 *real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. J. Vet.*  
287 *Diagn. Invest. 20, 64-67.*
- 288 *Ministerio da Saude, 2006. In: Ministerio da Saude - MS (Ed.). Manual de vigilancia e*  
289 *controle da Leishmaniose Visceral, Brasilia, p. 122.*
- 290 *Noyes, H.A., Stevens, J.R., Teixeira, M., Phelan J., Holz, P., 1999. A nested PCR for*  
291 *the ssrRNA gene detects Trypanosoma binneyi in the platypus and Trypanosoma*  
292 *sp. In wombats and kangaroos in Australia. Int. J. Parasitol. 29, 331-39.*
- 293 *Pinto, A.G.S., Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Barros, J.H.S., de*  
294 *Paula, C.C., Toma, H.K., Madeira, M.F., 2010. Isolation of Trypanosoma caninum*  
295 *in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitol. 137, 1653-1660.*
- 296 *Quaresma, P.F., Murta, S.M.F., Ferreira, E.C., Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P.,*  
297 *Gontijo, C.M.F., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis:*  
298 *Identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite*  
299 *DNA by real-time PCR. Acta Trop. 111, 289-294.*
- 300 *Reale, S., Maxia, L., Vitale F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., Vesco, G., 1999.*  
301 *Detection of Leishmania infantum in dogs by PCR with lymph node aspirates and*  
302 *blood. J. Clin. Microbiol. 37, 2931-2935.*
- 303 *Satow, M.M., Yamashiro-Kanashiro, E.H., Rocha, M.C., Oyafuso, L.K., Soler, R.C.,*  
304 *Cotrim, P.C., Lindoso, J.A., 2013. Applicability of kDNA-PCR for routine*

- 305 *diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital.*
- 306 *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 55, 393-394.
- 307 Silva, E.S., Gontijo, C.M.F., Pirmez, C., Fernandes, O., Brazil R.P., 2001. Short Report:
- 308 *Detection of Leishmania DNA by Polymerase Chain Reaction on blood samples*
- 309 *from dogs with visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 896-898.
- 310 Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., Souza, C.M., Figueiredo, F.B., 2011.
- 311 *Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the*
- 312 *leishmaniasis control program. Vet. Parasitol.* 179, 257-261.
- 313 Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L.,
- 314 Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. *Detection of Leishmania*
- 315 *infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical*
- 316 *leishmaniosis. Vet. Parasitol.* 147, 315-319.
- 317 Smith, A., Clark, P., Averis, S., Lybery, A.J., Wayne, A.F., Morris, K.D. Thompson
- 318 R.C., 2008. *Trypanosomes in a declining species of threatened Australian*
- 319 *marsupial, the brush-tailed bettong Bettongiapenicillata (Marsupialia: Potoroidae).*
- 320 *Parasitol.* 135, 1329-1335.
- 321 Souto, R.P., Vargas, N., Zingales, B., 1999. *Trypanosoma rangeli: Discrimination from*
- 322 *Trypanosoma cruzi based on a variable domain from the large subunit ribosomal*
- 323 *RNA gene. Exp. Parasitol.* 91, 306-314.
- 324 Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. *Polymerase*
- 325 *Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of*
- 326 *Leishmania infantum DNA in Dogs. J. Infect. Dis.* 189, 1729-1733.
- 327 Tavares, C.A., Fernandes, A.P., Melo, M.N., 2003. *Molecular diagnosis of*
- 328 *leishmaniasis. Expert. Rev. Mol. Diagn.* 3, 657-667.

329 Figure legend

330 Fig. 1. *Electrophoresis on agarose gel with representative samples of the study, showing*  
331 *the patterns of amplified products after PCR to target of 18S rDNA performed with*  
332 *samples of intact skin collected from domestic dogs.*

333 *Legend:*

334 *Lane 1: DNA ladder 100bp; Lane 2: negative control; Lanes 3-4: positive samples with*  
335 *T. caninum pattern; Lane 5: negative sample; Lane 6: positive samples with L. chagasi*  
336 *pattern; Lane 7: DNA control of T. caninum (intact skin); Lane 8: DNA control of T.*  
337 *caninum (culture); Lane 9: DNA control of L. chagasi (culture).*

Table 1

Table 1

Results obtained from molecular tools (PCR and sequencing) using skin fragments obtained from 229 dogs in Rio de Janeiro, Brazil.

Dogs		PCR 18S rDNA	Sequencing PCR 18S rDNA kDNA
		<i>T. L.</i> <i>caninum chagasi</i>	
Dogs with isolation of <i>T. caninum</i> * (n=11)	n	n	00
Dogs with isolation of <i>L. chagasi</i> * (n=12)	8	0	8 12
Culture negative dogs* (n=206)	16	14	2 2
Total	35	25	10 14

\* culture results obtained previously

## 5. Considerações gerais

*Trypanosoma caninum* constitui a mais recente espécie de tripanossomatídeo descrita no Brasil, infectando cães domésticos. É um agente ainda pouco estudado, sendo descrito em áreas onde a LVC é endêmica.

Neste estudo, confirmamos que no município do Rio de Janeiro, tanto *T.caninum* como *L.chagasi*, ocorrem em sobreposição como já demonstrado em outros estudos, nesse mesmo município (Silva et al., 2011) e na cidade de Cuiabá (Almeida et al., 2011). Essa sobreposição de áreas endêmicas tem sido apontada como um possível elemento de confusão nos inquéritos sorológicos para controle da LVC. Entretanto, considerando os nossos resultados, não observamos reatividade cruzada dos cães infectados por *T.caninum* aos testes de EIE-LVC e DPP, recomendados atualmente pelo Ministério da Saúde. Assim, nenhum dos animais infectados por esse agente, identificado neste estudo, seria eutanasiado por suspeita de LVC. Esse dado difere de outros autores, que relataram que a infecção por *T. caninum* pode confundir o diagnóstico da LVC (Madeira et al., 2009; Alves et al., 2012). No estudo de Silva et al. (2011), de 7 cães infectados por *T. caninum*, 2 foram reatores no EIE-LVC e no estudo de Alves et al. (2012), de 39 cães com infecção de *T.caninum* 19 foram reatores no EIE-LVC e 2 no DPP. Aqui, em nosso estudo, onde 229 cães foram estudados, observamos boa especificidade nos testes utilizados na rede pública para o diagnóstico da LVC.

O controle da LV no Brasil envolve, entre diversas ações, o diagnóstico e recolhimento de cães infectados por *L. chagasi* (Ministério da Saúde, 2006). Essa prática, apesar de seguir



recomendações do Ministério da Saúde brasileiro, tem sofrido críticas por não conter o avanço da doença, motivando discussões sobre o papel desses animais e as ferramentas aplicadas para o diagnóstico (Costa, 2011). Com base nessa discussão, recentemente o Ministério da Saúde brasileiro modificou a rotina dos inquéritos caninos, incorporando o teste DPP, fato que deu maior agilidade no diagnóstico e recolhimento dos animais infectados. Nesse contexto, a descrição de *T. caninum* nas diferentes áreas endêmicas de LV (Barros et al., 2012), pode incrementar tais discussões.

Dados clínicos da infecção por *T. caninum*, também são escassos e alguns resultados sugerem que esse parasito talvez não seja patogênico para os cães domésticos e que o curso da infecção seja assintomático e transitório (Madeira et al., 2014). Dos 11 cães infectados por *T. caninum*, identificados em nosso estudo, apenas um apresentou-se oligosintomático, entretanto, não podemos atribuir tal clínica à infecção já que outros fatores podem interferir na saúde animal. Estudos anteriores mostram que cães infectados por *T. caninum* apresentam-se em sua maioria em bom estado geral (Pinto et al., 2010; Almeida et al., 2011; Barros et al., 2012). No caso de infecção por *Leishmania chagasi*, dos 12 cães com isolamento de *L. chagasi*, apenas um apresentou sinais clássicos da LVC. Esses resultados reforçam que dados clínicos não devem ser considerados isoladamente para o diagnóstico, principalmente na infecção por *T. caninum* e *L. chagasi*. Nas áreas endêmicas de LV é muito comum a presença de cães infectados por *L. chagasi*, sem sinais clínicos, embora com prevalência muito variável, indo de 25% até cerca de 80%, em função da região geográfica e do método de diagnóstico adotado (Berrahal et al., 1996; Queiroz et al., 2009). A dificuldade para o diagnóstico clínico de forma acurada tem sido uma grande preocupação já que a LVC possui um espectro clínico variado (Quinnell et al., 2001; Mettler et al., 2005). No caso da infecção por *T. caninum* o desafio é ainda maior, pois os animais não apresentam qualquer sintomatologia sugestiva da infecção.

Os cães com isolamento de *L. chagasi*, identificados em nosso estudo, foram 100% reatores ao EIE-LVC, embora um desses cães tenha sido negativo ao DPP. Neste caso a sequência de testes recomendados pelo Ministério da Saúde não foi capaz de identificar este animal. Nesse animal o isolamento de *L. chagasi* foi obtido somente de lesão cutânea, tendo a pele íntegra apresentado resultado negativo na cultura. Segundo Reis et al. (2006) a investigação de diferentes amostras clínicas para o diagnóstico é importante, visto que a distribuição do parasito nos diferentes tecidos não é uniforme. Estudos demonstram que a densidade parasitária na pele de cães com LVC pode ser mais elevada em quadros clínicos mais graves (Reis et al., 2006).

De outro lado, quando comparamos os resultados da PCR (18S rDNA) com os resultados sorológicos (EIE-LVC e DPP) observamos que dois animais infectados por *T. caninum*, cuja infecção foi confirmada pela análise do sequenciamento sendo negativo na cultura, um foi reator ao EIE-LVC e negativo ao DPP e o outro foi reator somente DPP. Considerando tais resultados, esses animais não seriam eutanasiados, pois não houve confirmação entre os testes sorológicos. O ELISA-Tc foi reator para ambos animais.

No teste de ELISA-Tc observamos reatividade em 90 cães, mostrando uma prevalência de 39,3%. Entretanto, a técnica não foi capaz de detectar todos os casos parasitologicamente confirmados. Alves et al. (2012), em seu estudo, sugerem que *T. caninum* talvez seja pouco imunogênico para cães, o que poderia explicar tal resultado. Diferentemente, 11 dos 12 cães com isolamento de *L.chagasi*, foram sororeatores ao ELISA-Tc, demonstrando a reatividade sorológica cruzada entre esses parasitosou mesmo, a baixa especificidade do teste utilizado, mesmo empregando antígenos homólogos. Esse fato é bastante conhecido na literatura onde alguns autores relatam que testes sorológicos apresentam limitações principalmente em regiões onde há sobreposição de espécies (Andrade et al., 2006; Troncarelli et al., 2009).

Através da cultura, encontramos uma prevalência da infecção por *T. caninum* similar ao já relatado por outros autores (Pinto et al., 2010; Almeida et al., 2011). Entretanto, considerando o teste ELISA-Tc, encontramos uma prevalência superior. Esse resultado mostra a limitação da cultura e sugere que cerca de 40% dos cães estudados foram sensibilizados pelo possível contato com *T. caninum*.

Atualmente, não existem métodos sorológicos desenvolvidos especificamente para detecção de *T. caninum*. O ELISA-Tc, mesmo utilizando antígenos homólogos, apresentou acurácia moderada, fato que limita a utilização dessa ferramenta, de forma isolada, no diagnóstico de *T. caninum*. Para isso, a precisão desse teste deve ser aprimorada. Além disso, ferramentas mais sensíveis devem ser testadas, como exemplo a PCR.

A PCR é um método de grande aplicabilidade no campo diagnóstico. De acordo com os iniciadores utilizados, é possível até mesmo chegar a identidade ao nível de espécie. Resultados tem demonstrado alta sensibilidade superando técnicas convencionais de diagnóstico. Sua robustez também tem sido demonstrada com alta especificidade de acordo com o tipo de iniciador utilizado (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001; Manna et al., 2004; Strauss-Ayali et al., 2004; Leite et al., 2010). Com relação à LVC, vários autores consideram a PCR um importante recurso para o diagnóstico e estudos epidemiológicos (Gomes et al., 2007; Moreira et al., 2007; Leite et al., 2010). De modo geral, a PCR tem grande versatilidade, uma vez que, para sua realização, podem ser utilizadas variadas amostras clínicas (Tavares et al., 2003; Solano-Gallego et al., 2007; Manna et al., 2008; Leite et al., 2010).

O diagnóstico de *T. caninum* ainda é um desafio, pois a falta de conhecimento do ciclo biológico impõe certo limite à eleição da amostra clínica a ser analisada e das ferramentas mais adequadas para esse propósito. Aqui é importante mencionar que tanto a técnica quanto a amostra biológica analisada, possuem influência na sensibilidade e especificidade do teste

diagnóstico. A pele foi por nós escolhida por representar o único sítio de isolamento de *T. caninum*, já que tentativas de isolamento de diferentes espécimes clínicos apresentaram resultados negativos. Apesar das amostras de pele terem apresentado baixas quantidades de DNA, todas as amostras coletadas de cães positivos para *T. caninum* foram também positivas à PCR a partir do alvo utilizado. Outro dado importante e que reforça nossos resultados, foi a observação de que não houve inibição em nenhuma amostra.

Estudos empregando amostras de pele coletadas de cães de área endêmica de leishmaniose, mostraram que esse sítio constitui um excelente alvo para o diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. (Manna et al., 2004; Queiroz et al., 2011). Xavier et al. (2006) avaliaram diferentes técnicas de diagnóstico a partir de biopsias de pele de distintas regiões anatômicas de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e, concluíram que a combinação da PCR e a pele da orelha, apresentaram o melhor resultado. A detecção de amastigotas tem sido correlacionada com regiões de alta irrigação sanguínea no cão e a pele de orelha é apontada como de alta susceptibilidade à infecção via flebotomíneos (Travi et al., 2001). Em outro trabalho, foi demonstrado que a densidade parasitária em macrófagos foi equivalente na pele de cães com e sem sinais clínicos provenientes da região amazônica brasileira, utilizando-se o método de imunohistoquímica (Lima et al., 2010).

Neste estudo, através da PCR em fragmentos de pele, diagnosticamos a infecção por *T. caninum* em 25 (10,9%) dos 229 cães estudados, dos quais o isolamento foi obtido somente em 11 animais. Além disso, em 14 amostras foram identificadas somente na PCR, sendo a identidade de *T. caninum* confirmada através do sequenciamento. Esse resultado mostra a superioridade da PCR, em relação à cultura, como já demonstrado em outros estudos envolvendo tripanossomatídeos (Satow et al., 2013; Fraga et al., 2010).

Dez cães (oito com isolamento de *L.chagasi* e 2 parasitologicamente negativos) foram positivos na PCR-18S rDNA, mostrando um padrão de amplificação similar com o apresentado por DNA de amostra de referência de *L. chagasi*. Esse resultado foi confirmado pelo sequenciamento dos produtos amplificados. Entretanto, quando utilizamos alvo específico para gênero *Leishmania* sp. (PCR-kDNA), todos os 12 cães com isolamento de *L.chagasi* foram identificados. Essa maior sensibilidade utilizando o alvo do kDNA pode ser explicado pelo grande número de cópias de moléculas de minicírculos presentes no kinetoplasto dos parasitos do gênero *Leishmania* (Reale et al., 1999; Lachaud et al., 2002). Segundo Leite et al. (2010) o uso de diferentes métodos de PCR pode implicar em diferentes resultados para uma mesma amostra clínica. Outros autores também citam que diferentes métodos de PCR podem apresentar diferentes níveis de sensibilidades (Lachaud et al., 2002; Carson et al., 2010). Na comparação de quatro métodos de PCR incluindo a PCR-hibridização e variações de nested PCR para o diagnóstico molecular da LVC, foi verificado que a PCR-hibridização foi mais robusta por ter apresentado maior sensibilidade, além de permitir a diferenciação entre *L. chagasi* e *L. Braziliensis* (Pilatti et al., 2009).

Sabendo-se da sensibilidade limitada da cultura, neste estudo nos propomos avaliar ensaios baseados na PCR para o diagnóstico e rastreamento molecular de *T. caninum*. O fato de *T. caninum* ser ainda um parasito pouco estudado, não foi possível a utilização de marcadores espécie-específico. Até então, a identificação desse agente tem sido feito através de análises das sequencias dos produtos amplificados, utilizando alvos para região do gene ribossomal (18S rDNA) (Barros et al., 2012). Em nosso estudo, a utilização dessa ferramenta foi importante, já que permitiu a diferenciação do padrão de amplificação de *T. caninum* e *L. chagasi*. Esse resultado está de acordo com o relatado por Madeira et al. (2014).

Um dado interessante foi constatar que a PCR-18S rDNA mostrou menor sensibilidade para detecção da infecção por *T. caninum*, quando comparado com o ELISA-Tc. Quando comparamos os resultados da PCR com a sorologia, observamos que dos 25 animais identificados na PCR, somente 16 (64%) foram reatores. Entretanto, 66 animais sororeatores não foram detectados pela PCR. Esses resultados podem ser explicados pelas características de ambos os testes, cujos resultados podem variar em função da carga parasitária e da fase da infecção (Pineda et al., 1998; Araújo et al., 2002), embora sejam dados ainda desconhecidos na infecção por *T. caninum*. O ciclo biológico de *T. caninum* ainda não foi estabelecido e não se sabe se a pele constitui um bom alvo para o seu diagnóstico. Nesse contexto, estudos devem ser incentivados na pesquisa de alvos moleculares específicos, cuja aplicação poderá trazer informações adicionais sobre a história natural desse parasito.

Finalizando, este estudo demonstrou que *T. caninum* e *L. chagasi* coexistem em cães no Rio de Janeiro e que o diagnóstico da infecção por *T. caninum*, não pode ser dado ainda, por uma única ferramenta. Esse desafio permanece para estudos futuros, entretanto, mostramos que as ferramentas aqui aplicadas podem servir de auxílio em diferentes aspectos, sobretudo em áreas de sobreposição com as leishmanioses.

## 6. Conclusões

1. A partir do ELISA *in house* não foi possível detectar todos os casos de *T. caninum* parasitologicamente positivos;
2. Não houve reatividade cruzada entre os testes DPP e EIE-LVC nos cães parasitologicamente positivos com *T. caninum*;
3. A PCR com o alvo 18S rDNA identificou 25 animais infectados por *T. caninum* e 10 por *L. chagasi*;
4. A análise das sequências dos produtos de amplificação com o alvo 18S rDNA confirmaram o resultado obtido pela PCR;
5. A cultura parasitológica não detectou todos os cães infectados por *T. caninum* e *L. chagasi*.
6. *T. caninum* e *L. chagasi* coexistem em cães no Rio de Janeiro. ELISA-Tc e a PCR-18S rDNA são ferramentas auxiliares para o diagnóstico e rastreamento de *T. caninum*, sobretudo em áreas de sobreposição com *L. chagasi*.

## 7. Referências

- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 1991; 77: 557-561
- 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, Sousa VRF, Boa Sorte EC, Figueiredo FB, Paula DAJ, Pimentel MF, Dutra V, Madeira MF. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector-borne and Zoonotic Dis.* 2011; 11: 1555-1560
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57: 1-88
- Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Research in Veterinary Science.* 2012; 93:1329–1333
- Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro.* 2004; 20: 259-265
- Andrade HM, Reis AB, Santosa 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
- Araújo FMG, Bahia MT, Magalhães NM, Martins Filho AO, Veloso, VM, Carneiro CM, Tafuri WL, Lana M. 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
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker RH Jr, Badaró R, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53:251–255



- Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS, Baptista C, Madeira MF. 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
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55: 273-277
- Borja-Cabrera GP, Mendes AC, Souza EP, Okada LYH, Trivellato FAA, Kawasaki JKA, et al. Effective immunotherapy against canine leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 2004; 22:2234-2243
- Caballero ZC, Souza OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(8): 1045-49
- 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 áreas. *Exp Parasitol* 2010; 124: 253-257
- Campos MP, Silva DA, Madeira MF, Velho AA Jr, Figueiredo FB. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22(3):424-6
- Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, Courtenay O. Comparison of *Leishmania* OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine *Leishmania* infection. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3325-3330
- Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN; Paumgartten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1938; 33: 189-229
- Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96:1:S3-7
- Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MSM, Melo MN, Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1991; 24:21–25

- 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
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1314-1320
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol.* 2011; 24; 182(1):14-21
- Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Anez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop* 2006; 98(3):247-54
- Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96
- Cupolillo, E., Grimaldi, G.Jr., Momen, H., 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50, 296-311
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(4):352-6
- Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors.* 2009; 26
- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 2012;28(12):531-8
- Da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine.* 2000; 8:1082-92
- Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital.* 1955;47(1):75-87
- Deborggraeve S, Koffi M, Jamonneau V, Bonsu FA, Queyson R, Simarro PP, *et al.* Molecular analysis of archived blood slides reveals an atypical human *Trypanosoma* infection. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2008; 61: 428-433
- 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2009; 42: 77-78

- Ferec SA, Stopinski V, Courtney CH. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a sero-epidemiological survey in the eastern Caribbean basin. *Int J Parasitol.* 1990; 20:51-6
- Figueiredo FB, Filho CJB, Schubach EYP, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira MF. Report on an autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the southern zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010b; 43: 98-99
- 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 Sci Vet.* 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
- Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira J, Oliveira AL, Pirmez C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105: 310-3
- Franke CR, Greiner M, Mehlitz D. Investigation on naturally occurring *T.evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop* 1994; 58:159-69
- Gonçalves CCM, Reiche EMV, Abreu Filho BA, Silveira TGV, Felizardo TC, Maia KR, Curta RC, Padovese EJ, Dias Filho BP, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of american tegumentar leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66 (1): 91-102
- Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, Pereira-Chiocola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2007; 144: 234-241
- Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In *Proceedings. 2nd Int. Canine Leishmaniasis Forum, 2002*; p. 7-14
- Grimaldi G, Jr., Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106: 54-59

- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 2004 Nov; 34(12):1393-404
- Ijagbone IF, Staack C, Reinhard R. Fractionation of trypanosome antigens for species-specific sero-diagnosis. *Vet Parasitol.* 1989; 78:278-79
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. *Med Vet Entomol.* Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. 1997;11(2):105-11
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 210-215
- Leite RS, Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade ASR. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology.* 2010; 170, 201-206
- Lima LVR, Carneiro LA, Campos MB, Chagas EJ, Laurenti MD, Corbett CEP, Lainson R, Silveira FT. 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
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratloug F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104. 2007; 22: 9375-9380.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS, Figueiredo, FB, Baptista C, Marzochi, MCA. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100: 442-45
- Madeira, MF, Sousa, MA, Barros, JH, Figueiredo, FB, Fagundes, A, Schubach, A, de Paula CC, Faissal BNS, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MCA. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 2009; 136:411-423
- Madeira MF, Almeida ABPF, Barros JH, Oliveira TSF, Sousa VRF, Alves AS, Miranda LFC, Schubach AO, Marzochi MCA. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. *J Parasitol.* 2014, *In Press.*
- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008; 158: 274-287

- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 566-567
- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 1995 Aug;59(1):13-21
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004; 125: 251-262
- Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest.* 2008; 20: 64-67
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimaldi GJr, Momen, H, Pacheco RS, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel Júnior FB, Tramontano NC. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977–1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985; 80: 349–357
- Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi KB. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(5):570-80
- Maurício IL1, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000; 16(5):188-189.
- Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF; Oliveira RVC; Schubach TMP; Kiupel M, Langohr I. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. *J Clin Microb.* 2013; 51: 206-211
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5515-5519
- Molina AL, Tobo PR. *Biologia molecular Atualização: uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico.* Eisnten 2004; 2(2): 139-42
- Ministério da Saúde. In: Ministério da Saúde - MS (1ª ed.). *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral.* 2006; Brasília, p. 122
- Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 1.426. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2008; Brasília, DF.

- Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 01/2011 – CGDT/DEVIT/SUS/MS. Esclarecimento sobre a substituição do protocolo diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília, DF; 2011
- Monteiro S.G., Stainki D.R., Dalmolin F., Braccini E.T., Pinto-Filho S.T.L., Gaira M.S., Melo F.P. e Gontijo C.M.F. Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região sul do Brasil. Veterinária & Zootecnia. 2010; 17(4): 497-501
- Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007; 145: 245-252
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. In wombats and kangaroos in Australia. Int J Parasito. 1999; 29:331-39
- Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. 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
- Pilatti MM, Ferreira S A, de Melo MN, de Andrade AS. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. Res Vet Sci. 2009; 87: 255-257
- Pineda JP, Luqueti A, Castro C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:473-480
- Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Fagundes A, Barros JHS, de Paula CC, Toma HK, Madeira MF. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology. 2010; 137, 1653-1660
- Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW, Jeronimo SM, Ximenes MF. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. Res Vet Sci. 2009; 86: 267-273
- Queiroz NM, da Silveira RC, de Noronha AC, Jr., Oliveira TM, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet Parasitol. 2011; 178: 1-8
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitol. 2001; 122: 253-261
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2931-2935

- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. 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, Tafuri WL, Correa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 128: 87-95
- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(4):530-41
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 21-25
- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2352–2356
- Rosypal AC, Cortés-Vecino JÁ, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Vet Parasitol.* 2007; 149:172-77
- Santos JML, Dantas-Torre F, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCA, Brito FLC, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Simões-Mattos L. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, agreste de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:41–45
- Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IM, Camargo MC, D'Auria SR, Floeter-Winter LM. Occurrence of co-infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanosoma*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2005; 100, 739-741
- Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, Lindoso JA. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55: 393-9
- Shaw J, Voller A. The detection of circulating antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; 58: 349-352
- Silva ES, Gontijo CMF, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Short Report: Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 896-898

- 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
- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123: 311-330
- Souza- Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Men Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (Suppl.1): 167-80
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2007; 147: 315-319
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009; 165: 1-18
- Souza C. M., Silva E. D., Ano Bom A. P. D., Bastos R. C., Nascimento H. J., Silva Junior J. G. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins *Parasite Immunology.* 2012; 34, 1–7
- 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 bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitol* 2008;135: 1329-35
- Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999; 91: 306-14
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1729-1733
- Tafuri WL, Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WT. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001; 96: 203-212
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* 2004; 292: 17-23
- Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3: 657-667
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio 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



- 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: 118-123
- Vale AM, Fujiwara RT, da Silva Neto AF, Miret JÁ, Alvarez DCC, da Silva JCF. Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. *Zoo Public Health.* 2009; 56: 41-48
- Vasconcelos TCB, Alves FJ, Mendes Jr AAV, Madeira MF, Figueiredo FB. Canine visceral leishmaniasis: alochthonous case in Resende municipality, state of Rio de Janeiro. *Rev Bras Ciências Veterinária.* 2013; 20:80-83
- Vexenat AC, Santana JM, Teixeira AR. Cross-Reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1996; 38: 177-185
- Viol MA, Lima VM, Aquino MC, Gallo G, Alves IP, Generoso D, Perri SH, Lucheis SB, Langoni H, Nunes CM, Bresciani KD. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2012; 111(4):1607-13
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976; 70: 98-106
- Xavier SC, Andrade HM, Jamil S, Monte H, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res.* 2006;2: 1-7