UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Isabella Neves Aires

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO PARA *Leishmania* spp. E *Trypanosoma cruzi* EM CÃES E GATOS DO LITORAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Simone Baldini Lucheis
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2025

Isabella Neves Aires

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO PARA *Leishmania* spp. E *Trypanosoma cruzi* EM CÃES E GATOS DO LITORAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Simone Baldini Lucheis
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2025

A298e

Aires, Isabella Neves
Estudo epidemiológico para Leishmania spp. e Trypanosoma cruzi em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo / Isabella Neves Aires. -- Botucatu, 2025
162 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Virgínia Bodelão Richini Pereira

1. Zoonoses. 2. Tripanosomatídeos. 3. Animais domésticos. 4. Vigilância epidemiológica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELLA NEVES AIRES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 14 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 9h, no(a) Sala de reuniões 02 do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ISABELLA NEVES AIRES, intitulada **ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO PARA *Leishmania spp.* E *Trypanosoma cruzi* EM CÃES E GATOS DO LITORAL DO ESTADO DE SÃO PAULO**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa.Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. MARCIO GARCIA RIBEIRO (Participação Presencial) do(a) Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. APARECIDA HELENA DE SOUZA GOMES (Participação Presencial) do(a) Instituto Adolfo Lutz. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa.Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS

Isabella Neves Aires

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO PARA *Leishmania* spp. E *Trypanosoma cruzi* EM CÃES E GATOS DO LITORAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp, Campus Botucatu, para a obtenção do título de mestre(a) em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Comissão examinadora

_____

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

_____

Profa. Dra. Aparecida Helena de Souza Gomes

Botucatu, 14 de fevereiro de 2025

Dedicatória

Ao meu querido avô, Edson (in memoriam), por ter feito eu me apaixonar pelos animais e pela natureza desde muito pequena.

A todos os pesquisadores brasileiros, que contribuem para a ciência no país, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas.

A todos os médicos veterinários e funcionários das Unidades de Vigilância em Zoonoses, que lutam todos os dias contra o abandono e maus tratos aos animais.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer às Unidades de Vigilância em Zoonoses, às Divisões de Vigilância em Saúde, aos Departamentos de Proteção e Bem-estar Animal e às Secretarias de Saúde dos municípios que aceitaram participar dessa pesquisa, assim como os funcionários de cada uma das unidades, que possibilitaram as coletas de sangue dos cães e gatos desse estudo.

Um muito obrigada de coração aos meus pais, Marlon e Roberta, por todas as oportunidades que me proporcionaram e por sempre acreditarem e confiarem em mim, eu amo vocês!

Agradeço também ao meu amor, Thiago, que nesses oito anos me acompanha e sempre deseja meu melhor, te amo ♥

Aos meus filhos de quatro patas, Emma, Quira, Ellie, Kratos, Zelda e Bubba, pois minha vida não seria completa sem eles.

Obrigada também aos meus amigos Lívia, Wesley, Suzane, Thainá e Bel, obrigada por todos os ensinamentos ao longo desses anos e que muitos outros de amizade e noites de jogos possam vir!

Agradeço muito aos meus amigos e colegas que conheci através da Unesp Botucatu, Anelise, Suellen, Amanda, Jefferson, Marcos, Laís e Bruna por me ouvirem e me ajudarem sempre que possível, esses últimos dois anos teriam sido muito mais difíceis sem vocês!

Obrigada a todos os integrantes dos laboratórios de Zoonoses e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ao Instituto de Biotecnologia da Unesp de Botucatu e ao Instituto Adolfo Lutz de Bauru pelo auxílio nas técnicas utilizadas neste projeto!

Minha gratidão à minha orientadora Prof. Dra. Simone Baldini Lucheis e minha coorientadora Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira, por terem aberto as portas dos laboratórios e confiado no meu trabalho, sou extremamente grata por todo o aprendizado, desde 2017 quando comecei minha primeira Iniciação Científica, vocês tiveram um impacto gigante na minha formação acadêmica.

Ao financiamento concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2023/00076-9).

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a execução desta pesquisa!

RESUMO

AIRES, I. N. **Estudo epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo.** 162p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2025.

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, relevantes para a saúde pública, incluem parasitos de Doenças Tropicais Negligenciadas que afetam milhões de pessoas no mundo todo, bem como animais domésticos e silvestres, constituindo-se em importantes zoonoses. A leishmaniose visceral tem como agente *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* nas Américas; enquanto a leishmaniose tegumentar apresenta espécies como *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania major*, entre outras. O gênero *Trypanosoma* apresenta como principal espécie *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que infecta humanos e animais, os quais podem se infectar durante o repasto sanguíneo de vetores triatomíneos. Neste contexto foram investigados *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em 115 amostras de sangue de cães e 46 amostras de sangue de gatos, provenientes do abandono ou resgatados de maus tratos, alocados nas Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs) de seis (06) municípios do litoral do estado de São Paulo, Brasil, perfazendo 161 amostras. As amostras foram analisadas utilizando-se a técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *T. cruzi*, o teste molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR), bem como a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), com a utilização de *primers* específicos para *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *T. cruzi.* Também foi realizada a análise geográfica de distribuição dos casos positivos nos diferentes municípios estudados. No teste de RIFI, três (03) amostras (1,86%) de cães procedentes do município do Guarujá foram reagentes para *T. cruzi,* com título 20. Foi possível a realização dos testes moleculares em 157 amostras, tendo-se uma (01) amostra (0,64%) de cão do município de Peruíbe amplificado com o uso dos *primers* LCH14/LCH15 na cPCR, específicos para *Leishmania* (*L.*) *infantum*. As reações de qPCR apresentaram 51 (32,48%) amostras positivas para *T. cruzi,* de ambas as espécies e pertencentes a todos os municípios estudados; para *Leishmania* (*L.*) *infantum* todas foram negativas. Dessa forma, a pesquisa de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em animais domésticos provenientes das UVZs avaliadas permitiu a identificação de animais que possam atuar como possíveis reservatórios, como uma

forma de vigilância epidemiológica para estas enfermidades e a possibilidade de risco de transmissão da doença para a população residente, os funcionários dessas instituições e visitantes do litoral do estado de São Paulo.

Palavras-chave: Tripanosomatídeos, Zoonoses, Animais domésticos, Vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

AIRES, I. N. **Epidemiological study for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs and cats from the coastal region of the state of São Paulo.** 162p. Dissertation (Master's). Medical School, São Paulo State University. Botucatu, 2025.

The genera *Trypanosoma* and *Leishmania*, relevant to public health, include parasites responsible for Neglected Tropical Diseases that affect millions of people worldwide, as well as domestic and wild animals, constituting important zoonoses. Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in the Americas, while cutaneous leishmaniasis includes species such as *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania major,* among others. The genus *Trypanosoma* has *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) as its main species, which infects humans and animals that can become infected during the blood meal of triatomine vectors. In this context, *Leishmania* spp. and *T. cruzi* were investigated in 115 blood samples from dogs and 46 blood samples from cats obtained from animals that were either abandoned or rescued from mistreatment, located in Zoonosis Surveillance Units in six municipalities along the coast of São Paulo state, Brazil, totaling 161 samples. The samples were analyzed using the serological technique of Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) for *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, and *T. cruzi*, as well as the molecular techniques of conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) and real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR), using specific primers for *Leishmania* (*L.*) *infantum* and *T. cruzi.* Additionally, a geographical analysis of the distribution of positive cases in the studied municipalities was conducted. In the IFAT analysis, three samples (1.86%) from dogs in the municipality of Guarujá were reactive for *T. cruzi*, with a titer of 20. Molecular tests were performed on 157 samples, with one sample (0.64%) from a dog in Peruíbe amplified using the LCH14/LCH15 primers in cPCR, specific for *Leishmania* (*L.*) *infantum*. The qPCR reactions identified 51 positive samples for *T. cruzi* (32.48%), from both species, covering all studied municipalities, while all samples tested negative for *Leishmania* (*L.*) infantum. Thus, the investigation of *Leishmania* spp. and *T. cruzi* in domestic animals from the evaluated Zoonosis Surveillance Units enabled the identification of animals that may act as potential reservoirs, serving as a form of epidemiological surveillance for these diseases and highlighting the potential risk of disease

transmission to the local population, employees of these institutions, and visitors to the coastal region of São Paulo.

Keywords: *Trypanosomatids*, Zoonoses, Domestic animals, Epidemiological surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com destaque para os municípios que fizeram parte da pesquisa. Fonte: arquivo pessoal.....40

Figura 2. (A) Entrada da Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe, (B) parte externa do gatil, (C) gatos isolados com esporotricose e (D) baias individuais dos cães. Fonte: Arquivo pessoal.....51

Figura 3. (A) Amostra de sangue coletada de um dos cães do canil e (B, C) castrações sendo realizadas. Fonte: arquivo pessoal.....52

Figura 4. (A) Fachada da UVZ de Mongaguá, (B) coleta de sangue de um dos cães e (C) instalações do canil. Fonte: arquivo pessoal.....53

Figura 5. (A) Fachada da UVZ do Guarujá, (B, D) baias dos cães, (C) coleta de sangue de um dos cães, (E) gaiolas dos gatos com esporotricose e (F) espaço destinado aos gatos saudáveis, que possuem acesso a rua. Fonte: arquivo pessoal.....54

Figura 6. (A, B) Coleta de sangue de dois cães da UVZ de São Sebastião, por um dos médicos veterinários responsáveis pela unidade. Fonte: arquivo pessoal.....55

Figura 7. (A, B) Baias da UVZ de Ubatuba, (C) gatos soltos e (D) gaiolas para gatos em tratamento. Fonte: arquivo pessoal.....56

Figura 8. (A) Controle positivo utilizado na RIFI, (B) Amostras não reagente e (C) amostra reagente para *Trypanosoma cruzi* com título 20. Fonte: arquivo pessoal.....57

Figura 9. Aluna realizando a leitura das lâminas de RIFI. Fonte: arquivo pessoal.....57

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores β-1 e β-2 (140pb) para verificar a qualidade de amplificação do DNA extraído. Marcador de peso molecular 100pb; colunas 34 e 35 – controles positivos; 36 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.....58

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 561F e 561R (700pb) para a família Trypanosomatidae. Marcador de peso molecular 100pb; coluna 28 - controle positivo (*Leishmania infantum*); 29 - controle positivo (*Trypanosoma cruzi*); 30 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.....59

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores LCH14 e LCH15 (167pb) para a espécie *Leishmania* (*L.*) *infantum*. Marcador de peso molecular 100pb; coluna 7 – amostra 6P amplificada; colunas 33, 34 e 35 - controles positivos (*Leishmania infantum*)*;* 36 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.....59

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 121 e 122 (350pb) para a espécie *Trypanosoma cruzi*. Marcador de peso molecular 100pb; colunas 16, 17 e 18 - controles positivos (*Trypanosoma cruzi*); 19 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.....60

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores B1 e B2 (800pb) para a espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 35, 36, 37 e 38 - controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 39 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.....60

Figura 15. Gráfico da curva de amplificação de amostras de sangue de cães (2I, 3I e 4I), procedentes da Unidade de Vigilância de Zoonoses de Itanhaém, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.....62

Figura 16. Gráfico da curva de amplificação de amostras de sangue de cães (7M, 8M, 13M, 18M. 19M. 20M, 21M, 2U, 3U, 25U), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Mongaguá e Ubatuba, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.....63

Figura 17. Gráfico da curva de amplificação de amostras de sangue de cães (9P, 23P, 26P e 4G), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Peruíbe e Guarujá, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.....63

Figura 18. Gráfico da curva de dissociação de amostras de sangue de cães (2I, 3I e 4I) procedentes da Unidade de Vigilância de Zoonoses de Itanhaém, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.....64

Figura 19. Gráfico da curva de dissociação de amostras de sangue de cães (7M, 8M, 13M, 18M. 19M. 20M, 21M, 2U, 3U, 25U), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Mongaguá e Ubatuba, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.....64

Figura 20. Gráfico da curva de dissociação de amostras de sangue de cães (9P, 23P, 26P e 4G), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Peruíbe e Guarujá, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.....65

Figura 21. Gráfico da curva de amplificação do controle positivo para *Leishmania infantum*. Fonte: arquivo pessoal.....65

Figura 22. Gráfico da curva de dissociação do controle positivo para *Leishmania infantum*. Fonte: arquivo pessoal.....66

Figura 23. Mapa da localização do Estado de São Paulo no Brasil. Fonte: QGis.....66

Figura 24. Mapa do município de Peruíbe, que apresentou uma amostra positiva para *Leishmania infantum*. Fonte: QGis.....67

Figura 25. Mapa dos municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Guarujá, São Sebastião e Ubatuba, que apresentaram amostras de sangue de cães e gatos positivas para *Trypanosoma cruzi*. Fonte: QGis.....67

Figura 26. Mapa indicando o município de Guarujá, que apresentou amostras de sangue de cães reagentes para a técnica sorológica de RIFI para *Trypanosoma cruzi*. Destaca-se em vermelho o município de Guarujá e em verde, os municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, São Sebastião e Ubatuba. Fonte: QGis.....68

Figura 27. Mapa com a porcentagem de amostras positivas na qPCR para *Trypanosoma cruzi* por município. Fonte: QGis.....68

Figura 28. Localização da Unidade de Vigilância em Zoonoses do município de Peruíbe-SP, destacada em vermelho, rodeada por fragmentos de mata e residências. Fonte: Adaptado de Google Earth, 2024.....82

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Número de amostras de sangue coletadas de cães e gatos em cada Unidade de Vigilância de Zoonoses (UVZ), de diferentes regiões litorâneas do Estado de São Paulo.....41

Tabela 2. *Primers* utilizados e seus respectivos perfis de ciclagem.....44

Gráfico 1. Porcentagem de amostras testadas na pesquisa separadas por município.....69

Gráfico 2. Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue de cães e gatos procedentes de Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZs) do litoral do Estado de São Paulo.....70

Gráfico 3. Amostras positivas para *Trypanosoma cruzi* na Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real por município.....71

Tabela 3. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe.....141

Tabela 4. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Itanhaém.....143

Tabela 5. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Mongaguá.....145

Tabela 6. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses do Guarujá.....147

Tabela 7. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de São Sebastião.....149

Tabela 8. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Ubatuba.....151

Tabela 9. Quantificação do DNA das amostras de sangue extraídas.....153

Tabela 10. Relação de amostras positivas à qPCR para *Trypanosoma cruzi* por município.....160

Tabela 11. Cálculo do coeficiente de Fleiss's Kappa.....71

Tabela 12. Interpretação do nível de concordância dos valores Kappa.....72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....22
2.1 Leishmanioses.....22
2.1.1 Leishmaniose Visceral (LV).....22
2.1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....23
2.1.3 Ciclo de vida.....24
2.1.4 Epidemiologia.....24
2.1.5 Sinais clínicos.....26
2.1.6 Diagnóstico.....28
2.2 Doença de Chagas.....29
2.2.1 Formas de transmissão de *T. cruzi*.....30
2.2.2 Epidemiologia.....31
2.2.3 Sinais clínicos.....33
2.2.4 Diagnóstico.....34
2.3 Saúde Única e as Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs).....35
3 OBJETIVOS.....38
3.1 Objetivo Geral.....38
3.2 Objetivos Específicos.....38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....40
4.1 Comitê de Ética.....40
4.2 Procedência dos animais.....40
4.3 Animais da pesquisa e Colheita de sangue.....41
4.4 Local de realização dos exames.....42
4.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*.....42
4.6 Exames moleculares.....43
4.6.1 Extração do DNA.....43
4.6.2 Quantificação do DNA.....43
4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) a partir de amostras de sangue para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*.....44
4.6.4 Eletroforese em gel de agarose.....45
4.6.5 Controles.....46

4.6.6 Sequenciamento.....46
4.6.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....46
4.7 Devolutivas às Unidades de Vigilância em Zoonoses.....47
4.8 Georreferenciamento.....47
4.9 Análise Estatística.....48
5 RESULTADOS.....50
5.1 Condições das Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs).....50
5.1.1 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe.....50
5.1.2 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Itanhaém.....51
5.1.3 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Mongaguá.....52
5.1.4 Unidade de Vigilância em Zoonoses do Guarujá.....53
5.1.5 Unidade de Vigilância em Zoonoses de São Sebastião.....54
5.1.6 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Ubatuba.....55
5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*.....56
5.3 Exames Moleculares.....57
5.3.1 Quantificação do DNA.....57
5.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* e Eletroforese em Gel de Agarose.....58
5.3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* β-1 e β-2 (140pb).....58
5.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para a família Trypanosomatidae – V7/V8 – 561F/561R (700pb).....58
5.3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* LCH14/LCH15 (*Leishmania infantum*) (167pb).....59
5.3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* 121/122 (*Trypanosoma cruzi*) (350pb).....59
5.3.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* B1/B2 (*Leishmania braziliensis*) (800pb).....60
5.3.3 Sequenciamento Genético.....60
5.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....61
5.4 Georreferenciamento.....66
5.5 Análise Estatística.....69
6 DISCUSSÃO.....74

6.1 Diagnóstico dos Animais Testados.....74
6.2 Limitações do Estudo.....87
6.3 Considerações Finais.....88
7 CONCLUSÕES.....91
8 REFERÊNCIAS.....93
9 MANUSCRITO.....111
10 ANEXOS.....129
10.1 Anexo I.....129
10.2 Anexo II.....130
10.3 Anexo III.....131
10.4 Anexo IV.....132
10.5 Anexo V.....133
10.6 Anexo VI.....134
10.7 Anexo VII.....135
10.8 Anexo VIII.....136
10.9 Anexo IX.....137
10.10 Anexo X.....138
10.11 Anexo XI.....139
10.12 Anexo XII.....140
10.13 Anexo XIII.....141
10.14 Anexo XIV.....143
10.15 Anexo XV.....145
10.16 Anexo XVI.....147
10.17 Anexo XVII.....149
10.18 Anexo XVIII.....151
10.19 Anexo XIX.....153
10.20 Anexo XX.....160

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae consiste em um amplo grupo filogenético que reúne dezenas de espécies de protozoários de diversos gêneros, que despertam interesse médico, veterinário e agrícola. Esta família pertence à ordem Kinetoplastida, a qual inclui protozoários flagelados que apresentam uma estrutura que contém DNA extracelular condensado, chamada cinetoplasto (Castillo-Castañeda *et al*., 2022).

Devido à importância médica e relevância para saúde pública, uma vez que inclui agentes causadores de graves doenças tropicais negligenciadas, os tripanosomatídeos recebem maior atenção do que outros cinetoplastídeos (Kaufer; Stark; Ellis, 2020). Os tripanosomatídeos podem infectar todos os vertebrados existentes e apresentam invertebrados que atuam como vetores desses parasitos; mais de 900 espécies de vertebrados e mais de 500 invertebrados podem participar do ciclo destes protozoários (Podlipaev, 2001).

Dois gêneros de grande importância na família Trypanosomatidae são *Trypanosoma* e *Leishmania*, cujos parasitos podem causar doenças tanto em humanos como em animais, domésticos ou não (Lukes, 2009a), explicitando o interesse dos cientistas em estudar os mecanismos de interação hospedeiro-parasito-ambiente, que são refinados nesses gêneros.

Do ponto de vista epidemiológico, os cães desempenham papel importante porque vivem perto de habitações, onde servem como um elo entre os ambientes selvagens e peridomésticos (Roque *et al*., 2008; Freitas *et al*., 2018). Além disso, os cães podem ser sentinelas precoces para a detecção da infecção por *T. cruzi* e, assim, prevenir a transmissão para os humanos (Castillo-Neyra *et al*., 2015).

Os cães também têm a capacidade de manter a presença de *T. cruzi* no sangue em alta taxa e por um longo tempo (Gürtler *et al*., 1986). Esses animais podem sobreviver por oito anos com a infecção por *T. cruzi* (Lana *et al*., 1988); portanto, desempenham um papel importante na transmissão doméstica do ciclo do parasita. Outro aspecto que deve ser considerado do ponto de vista epidemiológico é a maior probabilidade de infecção de triatomíneos que realizam o repasto do sangue de cães, quando comparados aos humanos (Gürtler *et al*., 1996). Como os cães são infectados antes dos humanos no surgimento de novos casos (Castillo-Neyra *et al*., 2015), o monitoramento desses cães pode ser um indicador para atividades de combate a vetores, chamados de animais sentinelas (Pereira *et al*., 2021)

Em felinos, Eloy e Lucheis (2012) verificaram que a técnica de PCR foi adequada para a confirmação da detecção de *T. cruzi* em amostras de hemocultura, podendo assumir o papel de reservatórios domiciliares deste agente, o que reforça a necessidade de vigilância epidemiológica constante para esta zoonose. Na região do Texas (EUA), 19 de 167 gatos eutanasiados (11,4%) eram soropositivos para *T. cruzi* e três gatos (1,8%), dos quais um era soropositivo, apresentou PCR positivo para *T. cruzi* em tecidos (Zecca *et al.,* 2020).

A Leishmaniose felina (LF) em gatos domésticos tem sido relatada com a presença ou ausência de sinais clínicos, semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas comuns em gatos causadas por vírus (vírus da leucemia felina [FeLV] e vírus da imunodeficiência felina [FIV]), bactérias, fungos e outros protozoários. Em regiões endêmicas para LF, a infecção tem sido associada à presença de lesões dermatológicas em gatos, com a ausência de qualquer outro sinal clínico (Pennisi *et al., 2015)*.

Embora os relatos de leishmaniose em gatos estejam aumentando, o papel deste animal doméstico na ecoepidemiologia da doença permanece incerto (Alves-Martin *et al*., 2023). A falta de diagnóstico precoce de LF em áreas endêmicas sugere que os gatos continuam a apresentar riscos potenciais de transmissão de leishmaniose a vetores, uma vez que estudos demonstraram que a infecção em gatos pode permanecer ativa por longos períodos; assim, o risco de infectividade para flebotomíneos é mantido (Peterson; Barnes, 2020).

Em cães, a leishmaniose visceral é amplamente documentada, com vários relatos descritos (OPAS, 2021; Vilas-Boas *et al.,* 2024). Os cães são mais ameaçados pela doença e podem apresentar uma ampla gama de sinais clínicos, incluindo lesões de pele, onicogrifose, oftalmopatias e perda de peso (Silva *et al*., 2023). No entanto, é importante notar que a maioria dos animais infectados permanecem assintomáticos, ao mesmo tempo que servem como reservatórios (Akhtardanesh et al., 2021; Peris et al., 2021).

Neste contexto, foram investigados *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em amostras de sangue de cães e gatos alocados nas Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs) de municípios do litoral do estado de São Paulo, Brasil, como uma forma de vigilância epidemiológica para estas zoonoses, em ambientes onde até o momento não há relatos da infecção por estas enfermidades nestas espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, protozoários intracelulares obrigatórios, transmitidos por vetores (Mann *et al*., 2021). Pode apresentar diferentes formas clínicas, de acordo com a espécie e a relação do protozoário com o hospedeiro (Gontijo; Carvalho, 2003). A saber: forma visceral, mucocutânea e cutânea ou tegumentar (Longoni *et al*., 2012). Considerada uma doença tropical negligenciada, afeta as populações mais pobres de mais de 90 países pela África, Ásia, Oriente Médio e Américas Central e do Sul (Mann *et al*., 2021).

As leishmanioses podem ser causadas por mais de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania*, consideradas zoonoses, uma vez que humanos podem ser infectados se expostos ao ciclo de transmissão natural do parasito (Bezerra *et al*., 2019). A infecção causada pelo parasito também pode ser assintomática ou levar a um amplo espectro de doenças, dependendo da espécie de *Leishmania* e das características do hospedeiro (Galluzzi *et al*., 2018). Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* são diferentes espécies de flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* na Europa (Meinecke *et al*., 1999). No Brasil, foram catalogadas 274 espécies do gênero *Lutzomyia*, a maioria endêmica da região amazônica (Galardo *et al*., 2015).

2.1.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A leishmaniose visceral é uma das formas mais graves da leishmaniose, podendo ser fatal se não tratada. Nas Américas, em todo o hemisfério Leste e parte do Oeste, essa doença é causada majoritariamente pela espécie *Leishmania* (*L.*) *infantum* (Banu *et al*., 2019). O número de mortes relacionadas a LV no mundo é agravado pela deficiência de medidas de controle, migração e imunodeficiência (Bezerra *et al*., 2019). No Brasil, a principal espécie relacionada a transmissão da leishmaniose visceral é *Lutzomyia longipalpis* (Pinheiro *et al*., 2016).

O Brasil é responsável por 92% de todos os casos de LV notificados nas Américas (PAHO, 2024). Antigamente considerada uma doença rural, a leishmaniose visceral avança sobre os espaços urbanos atualmente, principalmente devido as modificações ambientais e ocupação desordenada, que favorece condições de vida precárias em relação ao saneamento básico e coleta de lixo. Além disso, a adaptação

dos vetores aos ambientes urbanos também contribui para a propagação da doença (Reis *et al*., 2017).

Os fatores que influenciam a epidemiologia da doença em áreas urbanizadas incluem os cães, que servem como reservatórios da leishmaniose visceral, além da densidade populacional e a presença do vetor nas áreas urbanas e periurbanas (Oliveira *et al.*, 2019a). Porém, apesar dos cães domésticos representarem os principais reservatórios urbanos da LV, animais sinantrópicos e outros animais selvagens de vida livre também podem ser naturalmente infectados, possibilitando a manutenção do ciclo de vida do parasito (Rangel; Vilela, 2008; Cardoso, 2015).

2.1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) inclui a leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucocutânea. O agente causador foi descrito em 1909, durante uma epidemia relacionada a construção da Estrada de Ferro Noroeste, no estado de São Paulo, onde a doença foi popularmente chamada de “úlcera de Bauru” (Vale; Furtado, 2005). No Brasil, a principal espécie relacionada a transmissão da leishmaniose tegumentar é *Lutzomyia whitmani*, adaptada às áreas urbanas, possibilitando que a doença seja transmitida dentro dos domicílios e na região de peridomicílio (Missawa; Maciel; Rodrigues, 2008).

É considerada uma zoonose subnotificada, e estima-se de 700 mil a 1,2 milhão de casos por ano (Mann *et al*., 2021). Nas Américas, somente em 2022, foram reportados mais de 37 mil casos de LT (PAHO, 2024). No Velho Mundo, a doença é causada principalmente pelo protozoário da espécie *Leishmania tropica* nos ambientes urbanos e *Leishmania major* nas áreas desérticas. Na América Latina, dois subgêneros são presentes: *Leishmania* (*Leishmania*), que engloba as espécies *Leishmania mexicana*, *L. amazonensis*, e *L. chagasi*; e *Leishmania* (*Viannia*), representado por *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania braziliensis* (Markle; Makhoul, 2004).

No Brasil, sete espécies já foram identificadas, das quais seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania.* Destas, as três espécies que recebem maior destaque no país são: *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, encontradas todas as regiões do país, e *Leishmania* (*V.*) *guyanensis,* restrita a região Norte (Brasil, 2017).

2.1.3 Ciclo de vida

A transmissão do parasito ocorre somente através da fêmea do inseto flebotomíneo, popularmente conhecido como mosquito-palha, que apresenta hábito hematófago, uma vez que necessita realizar o repasto sanguíneo para obter sangue para a maturação de seus ovos, transmitindo as formas infectantes do protozoário ao organismo vertebrado. O vetor é mais ativo no período da noite onde, ao se alimentar de um indivíduo infectado, ingere os macrófagos contendo o parasito. No intestino do mosquito, encontram-se as formas flageladas chamadas promastigotas que, durante o repasto sanguíneo, são inoculadas junto com a saliva do flebotomíneo na pele do hospedeiro, onde são fagocitadas pelos macrófagos e se transformam em amastigotas, perdendo o flagelo (Mann *et al.*, 2021). As amastigotas se multiplicam por bipartição binária e são encontradas nos tecidos, podendo causar as formas assintomática ou sintomática da doença. Em humanos, o período de incubação pode variar de 10 dias a 2 anos, ocorrendo, em média, entre 2 e 6 meses (Brasil, 2014).

Os hospedeiros podem ser classificados em: primários, vertebrados que apresentam o protozoário no ambiente silvestre e são responsáveis pela manutenção da infecção no ambiente; e os secundários, que são infectados, porém incapazes de manter o ciclo enzoótico na natureza. Os reservatórios primários de *Leishmania* são animais silvestres, como roedores e canídeos, porém, com o processo de domiciliação do ciclo zoonótico da transmissão da leishmaniose, animais sinantrópicos e domésticos assumiram papel como reservatórios da infecção (Dantas-Torres, 2007). A definição de reservatório tem mudado ao longo dos anos. São necessários estudos das zoonoses de forma mais ampla, onde, no caso das leishmanioses, a zoonose é mantida na natureza por várias espécies de mamíferos. Entretanto, ainda carecem dados que ajudem a entender o papel de cada reservatório na transmissão da *Leishmania* spp. (Roque; Jansen, 2014).

2.1.4 Epidemiologia

As leishmanioses ganharam destaque entre as doenças emergentes devido às alterações climáticas, migração da população e, principalmente, pela dificuldade em eliminar a infecção em animais que atuam como reservatórios do parasito (Longoni *et al.*, 2011). As mudanças ambientais que ocorrem atualmente, juntamente com a

migração de humanos e animais têm aumentado significativamente a dispersão de parasitos (Mohammadbeigi *et al*., 2020; Ursine *et al*., 2021).

No Brasil, o número de animais infectados no ambiente urbano e silvestre recebe destaque, uma vez que o desmatamento e as adaptações comportamentais dos vetores e reservatórios têm contribuído para a expansão da doença (Ferreira *et al*., 2015; Maia-Elkhoury *et al*., 2021). As espécies de flebotomíneos que atuam como vetores da zoonose em questão estão normalmente distribuídas de maneira desigual pela zona rural e urbana, tendo algumas espécies que possuem preferências por apenas uma dessas regiões. A presença de galinheiros e abrigos para outros animais está relacionada com o aumento no número de flebotomíneos no peridomicílio e, a proximidade dessa estrutura com quartos e outros cômodos da casa podem aumentar a probabilidade de infecção pelos moradores. Além disso, a proximidade de casas com fragmentos de floresta pode expor os moradores a infecções transmitidas pelos vetores do ambiente silvestre (Martínez *et al*., 2019).

Dados de 2014 a 2023 mostram que no Brasil foram registrados 26.469 casos humanos de leishmaniose visceral, com taxa de letalidade de 7,78%, totalizando 2.304 óbitos. Somente no ano de 2023, foram 1.567 casos novos, 71 deles pertencentes ao estado de São Paulo, que apresentou taxa de letalidade de 12,82% (Brasil, 2024a). Em relação a leishmaniose tegumentar, de 2014 a 2023, foram registrados 159.249 novos casos, com taxa de detecção de 67,43%. O ano de 2023 apresentou 13.091 casos, distribuídos em sua maior parte na região Norte do país, seguida da região Nordeste (Brasil, 2024b).

Vários registros apontam a infecção por parasitos causadores da leishmaniose tegumentar em animais domésticos, como cães (Lago *et al*., 2019) e gatos (Carneiro *et al*., 2020), sugerindo que estes podem ter papel importante na transmissão zoonótica da leishmaniose tegumentar no domicílio e peridomicílio atuando como reservatórios (Mondolfi *et al*., 2019). Em relação a leishmaniose visceral, os cães são os principais reservatórios no ambiente urbano. Assim, conhecer os fatores de risco associados a leishmaniose visceral canina é importante para compreender a ocorrência da leishmaniose visceral em humanos (Carvalho *et al*., 2019).

Em cães, a leishmaniose visceral é amplamente documentada, com vários relatos da relevância do cão na perpetuação do ciclo de vida do parasito em centros urbanos, uma vez que, o tratamento da leishmaniose visceral canina é caro e contínuo, necessitando de avaliações quadrimestrais com exames clínicos e

laboratoriais, levando ao abandono do tratamento, de forma que os cães continuam com alta parasitemia e atuando como fontes de infecção para vetores, constituindo problema de saúde pública. (OPAS, 2021; Vilas-Boas *et al.,* 2024). A Leishmaniose felina (LF) em gatos domésticos também tem sido relatada, com a presença ou ausência de sinais clínicos, semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas comuns em gatos causadas por vírus, como o vírus da leucemia felina (FeLV) e o vírus da imunodeficiência felina (FIV), bactérias, fungos e outros protozoários (Pennisi *et al*., 2015).

Casos de LF foram descritos em países da América do Sul (Coelho *et al.*, 2011; Silveira-Neto *et al*., 2011; Braga; Langoni; Lucheis, 2014; Oliveira *et al*., 2015), Europa (Spada *et al*., 2013; Pasa *et al.*, 2015; Can *et al*., 2016), Ásia (Hatam *et al.*, 2010) e África (Peterson; Barnes, 2020). A presença de infecções em gatos indica que estes animais também são importantes na epidemiologia da leishmaniose visceral, mesmo que seu papel como reservatório da doença no ambiente domiciliar ainda seja controverso (Metzdorf *et al*., 2017). Apesar da incerteza de aspectos dessa espécie na epidemiologia da doença e a falta do diagnóstico precoce em áreas endêmicas, os felinos continuam a apresentar um potencial de transmissão para os vetores flebotomíneos, uma vez que a infecção permanece ativa por períodos longos nesses indivíduos, sendo necessário considerar o contexto epidemiológico e a avaliação clínica/laboratorial dos animais para o efetivo diagnóstico da doença (Peterson; Barnes, 2020; Alves-Martin *et al*., 2023).

2.1.5 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral apresentam pontos em comum entre humanos e outros animais, consistindo em febre irregular por longos períodos, anemia, perda de tecido adiposo e musculatura (caquexia), com a consequente perda de peso nos estágios finais da doença. Em relação as manifestações clínicas em animais, os cães são mais ameaçados pela doença, além dos sintomas citados, podem apresentar alterações dermatológicas, como descamação da epiderme ao redor dos olhos e orelhas, alterações neurológicas, como convulsões, paralisia, dificuldade de locomoção, além de outros sintomas como a onicogrifose, pneumonia, miocardite, hemorragias, alterações oculares, insuficiência renal e hepática, entre outros (Marcondes *et al*., 2006; Silva *et al*., 2023).

Em regiões endêmicas para LF, a infecção tem sido associada à presença de lesões dermatológicas em gatos. Em alguns casos, observa-se somente uma lesão, com a ausência de qualquer outro sinal clínico (Pennisi *et al., 2015)*. Muitos animais infectados não apresentam nenhum sinal clínico da doença, mesmo após longo período de incubação, classificados como assintomáticos (Felipe *et al*., 2011). Mesmo assintomáticos, estes animais ainda apresentam alta carga parasitária, podendo agir como reservatório do parasito caso existam vetores no ambiente, contribuindo para a transmissão da leishmaniose visceral (Brasil, 2014; Akhtardanesh et al., 2021; Peris et al., 2021).

As manifestações clínicas nos humanos são divididas nos diferentes estágios da doença. O período inicial é caracterizado principalmente pela febre, palidez cutaneomucosa e início de hepatoesplenomegalia. No período de estado, a febre torna-se irregular e o paciente começa a perder peso, com hepatoesplenomegalia e comprometimento do estado geral após alguns meses de evolução da doença. No estágio final da doença, caso não seja diagnosticada e tratada, ocorre febre contínua, desnutrição, edema nos membros inferiores e risco de infecções bacterianas e sangramentos, sendo o óbito geralmente associado a estes dois últimos (Brasil, 2014).

Em relação a leishmaniose tegumentar, as diferentes características da resposta imunológica do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* irão ocasionar manifestações clínicas distintas da doença, variando desde indivíduos assintomáticos até lesões cutâneas extensas, com risco de morte (David; Craft, 2009). As manifestações clínicas da forma cutânea geralmente se iniciam com pequenas manchas no local após a picada do vetor. Essas manchas evoluem para pápulas ou pequenos nódulos que, por sua vez, podem formar úlceras, causando a destruição de tecidos (Reithinger *et al*., 2007). As úlceras apresentam-se em áreas expostas da pele, possuem bordas elevadas e bem definidas, com fundo granuloso e são geralmente indolores (Brasil, 2017).

A forma mucosa apresenta sinais como disfagia e odinofagia, rouquidão, obstrução nasal, sangramento, presença de crostas e, em casos mais graves, a destruição do septo nasal (Brasil, 2017). A forma mucocutânea da leishmaniose tegumentar possui como manifestações clínicas a destruição dos tecidos e das membranas mucosas, sendo o nariz, boca e garganta as regiões mais atingidas (WHO, 2015).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico sorológico da leishmaniose pode ser realizado pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ou o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Até 2012, a LVC era diagnosticada utilizando-se a RIFI como triagem, e o método recomendado para a confirmação dos casos positivos na triagem era o teste de ELISA (BRASIL, 2014). Para melhorar a acurácia no diagnóstico da LVC, o Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral (PCVLV) recomenda atualmente a utilização de um teste rápido imunocromatográfico, compreendendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, o DPP (*Dual-Path Plataform*; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), para a triagem de cães infectados, e o teste de ELISA para confirmar os resultados positivos (BRASIL, 2011; Coura-Vital *et al*., 2014).

Os resultados dos exames sorológicos geralmente consistem em títulos baixos, podendo permanecer positivos por período longo. No caso da sorologia, pacientes que apresentam cura clínica ou que possuem qualquer tipo de leishmaniose podem apresentar positividade (Brasil, 2014). Ademais, em áreas endêmicas para a doença de Chagas e leishmanioses, pode haver reação cruzada com o teste sorológico de RIFI entre *T. cruzi* e as espécies do gênero *Leishmania* (Luciano *et al*., 2009).

No teste sorológico, procura-se no animal a identificação de anticorpos específicos para o parasito. Outro teste imunológico, utilizado principalmente para a detecção da leishmaniose tegumentar, é a Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM), que procura detectar resposta primária da leishmaniose tegumentar em humanos, mesmo que não existam manifestações clínicas. Esta técnica consiste na injeção de solução salina contendo o antígeno, a fim de avaliar a resposta de hipersensibilidade, como a formação de eritema ou erupções cutâneas, considerado marcador da resposta imune celular (Brasil, 2017).

Além dos testes imunológicos, o diagnóstico também pode ser parasitológico, com a identificação morfológica do parasito em esfregaço do sangue do paciente ou em lâminas de tecidos, como baço, fígado e rins, na forma de amastigotas (Thakur; Joshi; Kaur, 2020). Outro diagnóstico parasitológico é o xenodiagnóstico, sendo capaz de identificar a infecciosidade do reservatório. Este método consiste em alimentar flebotomíneos criados em laboratório com o sangue do possível reservatório,

observando em seguida no intestino dos vetores as formas promastigotas (Mondal, 2019).

Outros métodos utilizados no diagnóstico das leishmanioses são os moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica altamente sensível e específica, que detecta o DNA do parasito em vários tipos de amostras biológicas (Ikonomopoulos *et al*., 2003). A técnica de PCR convencional (cPCR) é capaz de identificar a presença do DNA do parasito, enquanto a PCR em tempo real (qPCR) é capaz de quantificar o DNA alvo, apresentando também alta sensibilidade. A qPCR possibilita a identificação das espécies de *Leishmania* quando associada a técnica de perfis de dissociação em alta resolução (HRM), que detecta diferenças termodinâmicas na composição de nucleotídeos de acordo com os perfis da curva de dissociação dos amplicons (Zampieri *et al*., 2016).

O sequenciamento genético também é uma técnica para identificar a espécie do parasito e fornecer um diagnóstico preciso, realizado após a Reação em Cadeia da Polimerase convencional (Thakur; Joshi; Kaur, 2020). Além disso, o uso de técnicas combinadas, como as sorológicas e moleculares, auxilia na identificação de maior número de animais positivos em áreas endêmicas (Gramiccia; Gradoni, 2005).

2.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é considerada uma importante zoonose tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e constitui grave problema de saúde pública. Causada pelo protozoário *T. cruzi,* considerada uma antropozoonose, infectando diversas espécies de vertebrados, incluindo os humanos. Transmitida pelos insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros. Somente na América Latina apresenta cerca de 30 mil casos novos por ano e estima-se que em torno de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco na região (Ministério da Saúde, 2024).

Descrita pela primeira vez em 1909 pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas, afeta principalmente pessoas em situação de vulnerabilidade social. As condições de habitação, educação, saneamento, além da degradação ambiental e alterações climáticas são fatores que influenciam a transmissão da doença aos humanos (Guhl; Ramírez, 2021).

A forma de transmissão vetorial ocorre por triatomíneos, os quais são hematófagos e transmitem o parasito pelas fezes e urina durante o repasto sanguíneo; pertencem a diferentes espécies, dependendo da região em que se encontram (WHO, 2024).

Anteriormente, a espécie *Triatoma infestans* era considerada o principal vetor da doença no Brasil, porém devido ao alto número de casos, campanhas de erradicação do vetor foram bem-sucedidas ao final dos anos 80 (Silva *et al*., 1998). Entretanto, outras 68 espécies de triatomíneos estão presentes no Brasil, dos quais 13 têm importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas. Dessas espécies, que apresentam grande potencial de colonização e invasão, destacam-se *Rhodnius neglectus, Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis*, adaptadas tanto a ambientes silvestres como domiciliares e peridomiciliares (Ministério da Saúde, 2019).

2.2.1 Formas de transmissão de *T. cruzi*

A transmissão vetorial após o repasto sanguíneo dos triatomíneos libera as formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes de *T. cruzi* e atingem a corrente sanguínea do vertebrado pela abertura na pele pelo vetor durante o repasto ou mucosas (Guhl, Ramírez, 2021). Os vetores triatomíneos possuem como hábitat natural frestas encontradas em pedras, palmeiras e cascas de árvores, mas também podem possuir refúgios próximos a vertebrados para a realização do repasto sanguíneo. No ambiente urbano, os insetos formam colônias em áreas peridomiciliares ou até mesmo dentro do domicílio, e se alimentam durante a noite de sangue de animais e dos humanos (Lazzari; Pereira; Lorenzo, 2013). Além dos humanos, *T. cruzi* pode infectar vários animais domésticos, como cães, gatos, galinhas e bovinos, e sinantrópicos, como marsupiais, morcegos e roedores (Coura, 2015).

Ao adentrarem o hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas metacíclicas, diferenciam-se em amastigotas, formas arredondadas que se replicam dentro das células fagocíticas mononucleares do hospedeiro (principalmente macrófagos) e, em seguida se alongam, readquirindo seus flagelos e se transformando em tripomastigotas, rompendo a membrana celular, novamente atingindo a circulação sanguínea, possibilitando que possam ser ingeridas pelos triatomíneos em um novo

repasto sanguíneo. Dentro dos vetores, as tripomastigotas chegam ao intestino e se transformam em epimastigotas, que se proliferam e depois se transformam em tripomastigotas metacíclicas (Martín-Escolano *et al*., 2022).

Além da transmissão vetorial, várias formas de contrair a doença de Chagas foram registradas, como a transmissão por transfusão sanguínea, principalmente em países endêmicos que não realizam triagem para *T. cruzi* nas doações de sangue, mas também em países não endêmicos, devido a migração de pessoas provenientes de áreas endêmicas que podem carregar o parasito. Também pode ocorrer a transmissão por transplante de órgãos, além de acidentes em atividades laboratoriais de diagnóstico ou pesquisa (Coura, 2015). A transmissão congênita, que ocorre através da placenta durante a gestação e a galactogênica, durante a amamentação, têm assumido relevância epidemiológica, devido a migração de mulheres com casos agudos de infecção, ocorrendo em 5 a 10% dos recém-nascidos de mães com a doença de Chagas, associada a alta taxa de morbimortalidade neonatal (Messenger; Bern, 2018).

A forma de infecção pelo *T. cruzi* pela via oral está assumindo importância epidemiológica considerável, considerada atualmente a principal forma de transmissão da doença de Chagas aguda, principalmente na região Norte do país, mas também com surtos já registrados em outras regiões (Ministério da Saúde, 2019).

Os surtos de infecção aguda ocorrem após o consumo de alimentos contaminados com as formas tripomastigotas. A contaminação dos alimentos pelo *T. cruzi* relaciona-se à presença de fezes de triatomíneos infectados na superfície ou à trituração desses insetos durante o seu processamento, como no caso do açaí e do caldo de cana-de-açúcar (Passos *et al*., 2012; Coura, 2015; Steindel *et al*., 2008; Zaparolli *et al*., 2022). Nas últimas décadas, a ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com triatomíneos inteiros ou suas fezes contendo tripomastigotas metacíclicas tem sido responsáveis por muitos casos da doença de Chagas (Noya; González, 2015).

2.2.2 Epidemiologia

Com a degradação ambiental provocada pelos humanos, como práticas agropecuárias e o avanço urbano nas áreas rurais, os tripanosomas, principalmente *T. cruzi*, que antes restringiam-se ao ciclo silvestre, passaram a ter seus vetores

invadindo habitações humanas, alimentando-se do sangue de animais domésticos do peridomicílio, como cães, gatos, caprinos, ovinos e, principalmente, aves (como galinhas), além dos próprios humanos (Barreto, 1967; Coura, 2013).

O repasto sanguíneo realizado em animais da família Didelphidae, como gambás, contribui para a manutenção de reservatórios nas cidades, uma vez que apresentam alta susceptibilidade de infecção natural por *T. cruzi*. Dessa forma, a presença desses marsupiais infectados por *T. cruzi* no ambiente doméstico torna-se uma ameaça de infecção para a população (Bezerra *et al*., 2018).

Como enfermidade negligenciada, a doença de Chagas afeta, principalmente, comunidades de alta vulnerabilidade social, que apresentam baixa renda, moradia e condições de higiene precárias, além de baixos níveis de escolaridade (Miranda *et al*., 2019). Somente em relação a doença de Chagas crônica, estima-se uma prevalência de 1 a 2,4% da população, que equivale a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas com a forma crônica da doença no país, resultando em alta mortalidade. No ano de 2019, foram registrados 4.287 óbitos que tiveram como causa básica a doença de Chagas. Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia tiveram as maiores frequências, respectivamente (Brasil, 2022a).

Em relação a doença de Chagas aguda, no período de 2010 a 2020 foram reportados 2777 casos no país, dos quais 2.343 (84,4%) dos casos pertencentes a região Norte (Brasil, 2022a). No período de 2012 a 2016, 73% dos casos de doença de Chagas aguda estavam relacionados a transmissão oral, seguido da transmissão vetorial, relacionada a 8,9% de casos (Brasil, 2019).

Apesar de apresentar alta carga de morbimortalidade, somente 7% das pessoas com doença de Chagas são diagnosticadas e apenas 1% recebe o tratamento adequado. Os benefícios do diagnóstico e tratamento precoce incluem a prevenção da transmissão congênita em futuras mães, cura sorológica em bebês e crianças e redução da progressão para formas clínicas avançadas da doença nas pessoas infectadas (Ministério da Saúde, 2024).

Na epidemiologia em relação aos animais domésticos merece destaque os cães, pois estes vivem perto das habitações e servem como um elo entre os ambientes selvagens e peridomésticos, sendo o último obstáculo antes do parasita atingir os humanos (Roque *et al*., 2008). Além disso, os cães são considerados sentinelas, indicando de forma precoce a transmissão ativa ou reemergência da transmissão do *T. cruzi* e, assim, podem prevenir a transmissão para humanos,

evidenciando a necessidade de serem incluídos nos programas de controle de zoonoses para o direcionamento de ações preventivas (Castillo-Neyra *et al*., 2015). Os cães também têm a capacidade de manter a presença de *T. cruzi* no sangue em alta taxa e por um longo tempo (Gürtler *et al*., 1986). Esses animais podem sobreviver por oito anos com a infecção por *T. cruzi*. Muitos animais evoluem para a fase crônica indeterminada, dificultando o diagnóstico e possibilitando que atuem como reservatórios por longo período (Lana *et al*., 1988); portanto, desempenham papel importante na transmissão doméstica do ciclo do parasita. Além disso, do ponto de vista epidemiológico, o repasto sanguíneo dos triatomíneos em cães apresenta maior probabilidade de infecção quando comparados aos humanos, devido a alta parasitemia (Gürtler *et al*., 1996).

Em felinos, Eloy e Lucheis (2012) verificaram, pela detecção de *T. cruzi* em amostras de hemocultura, que gatos infectados também possuem atuam como reservatórios domiciliares da doença, contribuindo para a manutenção do ciclo de vida do parasito no ambiente, o que reforça a necessidade de vigilância epidemiológica constante para esta zoonose.

2.2.3 Sinais Clínicos

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: a primeira, chamada de fase aguda, que é caracterizada por alta parasitemia no sangue, onde o parasita se multiplica e infecta macrófagos, fibroblastos e células musculares; a segunda fase é chamada de crônica, onde com o passar dos anos pode ocorrer a manifestação de sintomas, como a cardiomiopatia chagásica, sintoma clínico mais frequente e fatal (Sereno *et al*., 2020). Considerada uma doença multissistêmica, a fase aguda pode durar algumas semanas ou meses, e geralmente apresenta manifestações clínicas leves ou infecções assintomáticas (Ministério da Saúde, 2024).

A fase crônica da doença, consiste em um período longo, onde o paciente permanece assintomático por muitos anos ou apresenta sintomas como cardiomiopatias, megacólon e megaesôfago (Brasil, 2024c). Afeta de 30 a 50% dos pacientes infectados com *T. cruzi* e algumas manifestações clínicas são a síndrome arrítmica, insuficiência cardíaca e complicações tromboembólicas sistêmicas e pulmonares, diminuindo a expectativa de vida do paciente. Além da forma cardíaca, a fase crônica também pode apresentar as formas digestória ou cardiodigestiva (Ministério da Saúde, 2024). O período de incubação, da infecção aos primeiros

sintomas depende do tipo de transmissão, das quais a transmissão vetorial de 4 a 15 dias, a oral de 3 a 22 dias, transfusional de 30 a 40 dias e a congênita com tempo indeterminado, podendo ocorrer em qualquer período da gestação ou durante o parto (Brasil, 2024c).

Em relação as manifestações clínicas em animais, a maioria são assintomáticos na fase aguda da doença, porém alguns podem apresentar sintomas como febre, diarreia esplenomegalia e linfadenopatia. Alguns sintomas como megacólon e megaesôfago também podem ser observados em cães, tanto na fase aguda quanto crônica da doença de Chagas. Cães e gatos cronicamente infectados também podem desenvolver miocardites progressivas, arritmias e insuficiência cardíaca, que podem levar o animal a óbito (Freitas *et al*., 2022).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado pelo exame parasitológico direto, como a detecção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em esfregaço sanguíneo em lâmina. Esse tipo de exame diagnóstico é considerado pelo Ministério da Saúde o “padrão ouro” na detecção da doença de Chagas aguda, uma vez que o parasito apresenta alta parasitemia no sangue. Na detecção da forma crônica da doença, as melhores técnicas são as sorológicas, investigando anticorpos IgG, produzidos em fase mais tardia da infecção, como as técnicas de ELISA e RIFI, que apresentam alta sensibilidade e especificidade (FIOCRUZ, 2024).

O diagnóstico da doença de Chagas também pode ser firmado pelas técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase convencional, que apresenta alta sensibilidade e especificidade. Neste caso, o material coletado pode influenciar no resultado, uma vez que as amostras de sangue possibilitam a identificação da fase aguda da doença (Kaufer; Stark; Ellis, 2020).

Na fase crônica da doença, o DNA proveniente de biópsias de tecidos apresenta resultados melhores, uma vez que as formas amastigotas se encontram nos tecidos, porém o diagnóstico molecular nesta fase é menos utilizado devido ao grau de invasividade na coleta da amostra (FIOCRUZ, 2024).

Dois alvos de interesse no diagnóstico molecular de *T. cruzi* são o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto, ou kDNA, que apresenta regiões menores e conservadas e estão presentes em milhares de cópias, considerado o melhor alvo para o diagnóstico da doença de Chagas (Guarner, 2019). No diagnóstico molecular, o sequenciamento

genético pode ser utilizado para a confirmação do diagnóstico, e também utilizado para a identificação de trechos conservados de tripanosomatídeos. Além da PCR convencional, a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) também fornece diagnóstico preciso, possibilitando a quantificação dos parasitos na amostra utilizada (Schijman, 2018).

2.3 Saúde Única e as Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs)

As zoonoses, em sua maioria, eram anteriormente doenças infecciosas restritas aos animais. Porém o desequilíbrio ecológico e o avanço urbano sobre as regiões de manutenção do ciclo de vida natural dos parasitos resultaram na infecção dos humanos (Jones *et al*., 2008). Cerca de 70% das doenças infecciosas que ameaçam a saúde pública têm relação com os animais, de forma que as zoonoses e o papel dos animais na epidemiologia dessas doenças tornaram-se preocupação significativa para a saúde pública (Schneider *et al*., 2019).

Observando as relações entre as mudanças ambientais, a presença de animais e vetores responsáveis pela transmissão dessas zoonoses no ambiente rural e urbano, o risco de infecção dos humanos, o conceito *One Health*, também conhecido como “Uma Só Saúde” ou Saúde Única, nos permite integrar a saúde humana, animal e ambiental, a fim de prever e controlar a transmissão das zoonoses (Schneider *et al*., 2019).

Com grande relevância atualmente, o controle de zoonoses pela perspectiva da Saúde Única tem tido a participação de órgãos internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (WHO/OMS), a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE/OMSA), o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP/PNUMA) e a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO/OPAS) (Schneider *et al*., 2019).

Há poucos estudos investigando *T. cruzi* em animais domésticos procedentes de unidades de vigilância de zoonoses ou de abrigos que recebem e mantém animais domésticos, principalmente cães e gatos, que normalmente são abandonados. Cruz e colaboradores (2020) verificaram a ocorrência de *T. cruzi* em cães de abrigos procedentes de Aracaju (SE), pela técnica de PCR convencional utilizando os primers TCZ1/TCZ2. De 168 amostras de sangue, 17 (10,1%) foram positivas, indicando a infecção por *T. cruzi* na região e a necessidade de vigilância epidemiológica para a

zoonose, bem como a importância da Saúde Única para a detecção e monitoramento das enfermidades zoonóticas.

A Saúde Única permite a colaboração de diferentes disciplinas, profissionais e instituições, procurando soluções de forma abrangente e efetiva. O exercício do conceito de Saúde Única no Brasil tem vários objetivos previstos, incluindo a vigilância epidemiológica e controle das zoonoses, doenças tropicais negligenciadas, doenças transmitidas por vetores e a conscientização da população sobre a relação direta e indireta entre a saúde humana, animal e ambiental (Brasil, 2024d).

Entre as instituições com papel essencial no controle de zoonoses e que podem contribuir para o estabelecimento da Saúde Única estão as Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs), antigamente chamadas de Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) e os Departamentos de Proteção e Bem-Estar Animal.

A responsabilidade dos municípios está na adoção de políticas públicas que possibilitem o funcionamento eficaz dessas instituições nas estratégias de vigilância (Rodrigues *et al*., 2017). Os cães e gatos recolhidos por essas instituições são periodicamente manipulados por veterinários do local, possibilitando realizar coletas de sangue sem causar estresse desnecessário a esses animais. Portanto, a parceria dessas instituições com universidades e outros órgãos de pesquisa produz dados epidemiológicos que podem auxiliar o monitoramento da transmissão das zoonoses nos municípios.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZs) dos municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Guarujá, São Sebastião e Ubatuba, no litoral do estado de São Paulo;

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar, por testes moleculares e sorológicos, a ocorrência de *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos;
- Avaliar a distribuição geográfica da leishmaniose e doença de Chagas em cães e gatos no litoral de São Paulo;
- Propor medidas para diminuição do risco de transmissão das doenças na região, contribuindo para a vigilância epidemiológica.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da UNESP, registrado com nº 1434/2023 (Anexo I).

4.2 Procedência dos animais

Os cães e gatos incluídos no estudo foram provenientes do resgate de abandono nas ruas e maus tratos de animais nos municípios localizados no litoral do Estado de São Paulo, na Região Sudeste do país. Estes animais estão alocados nas Unidades de Vigilância de Zoonoses e Departamentos de Proteção Animal dos municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Guarujá, São Sebastião e Ubatuba, sendo quatro instituições do litoral Sul do estado e duas do litoral Norte (Figura 1). As autorizações de coleta foram feitas pelos diretores de cada instituição conforme consta nos Anexos II a VII.

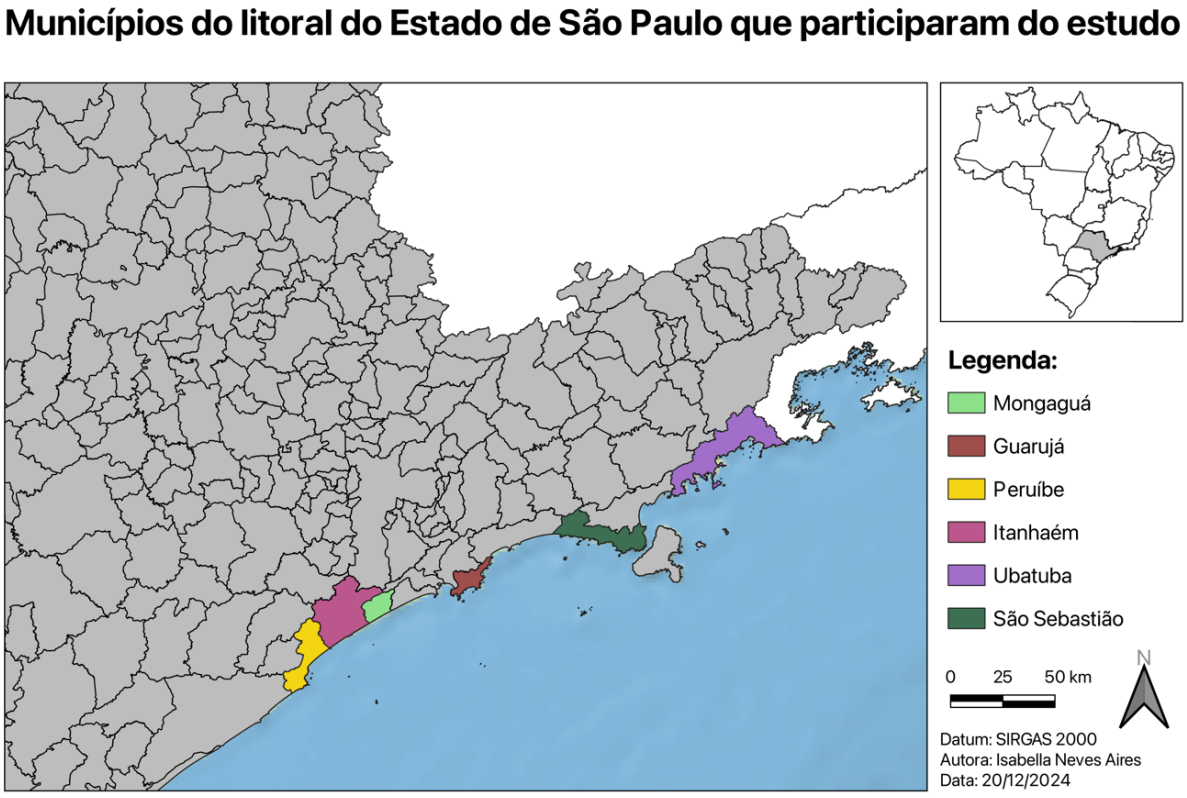


Figura 1. Mapa com destaque para os municípios que fizeram parte da pesquisa.

Fonte: arquivo pessoal.

4.3 Animais da pesquisa e Colheita de sangue

Foram coletadas amostras de sangue de 161 animais, 115 cães e 46 gatos, de ambos os sexos e de diferentes idades, foi possível diferentes números de coletas de amostras de sangue de cães e gatos, de acordo com a facilidade de manejo do animal e estado de saúde, em cada Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ). As coletas ocorreram entre os meses de julho e novembro de 2023. A quantidade de cães e gatos por UVZ está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Número de amostras de sangue coletadas de cães e gatos em cada Unidade de Vigilância de Zoonoses (UVZ), de diferentes regiões litorâneas do Estado de São Paulo.

Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZ)	**Número de amostras de cães**	**Número de amostras de gatos**	**Total**
Peruíbe	20	11	31
Itanhaém	8	23	31
Mongaguá	20	1	21
Guarujá	30	0	30
São Sebastião	17	4	21
Ubatuba	20	7	27
Total	115	46	161

A coleta do sangue foi realizada pelo veterinário responsável da instituição quando houvesse a necessidade de manejo do animal, como administração de medicamentos e exames clínicos, realizada por punção venosa periférica, após a assepsia com álcool 70%.

Uma alíquota do sangue coletado foi acondicionada em tubos vacutainer® contendo EDTA, para a realização das técnicas moleculares de cPCR e qPCR para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, enquanto outra alíquota foi destinada para tubo seco, para obtenção do soro e realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. As amostras foram refrigeradas e acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável, sendo encaminhadas para o laboratório em seguida.

4.4 Local de realização dos exames

Os procedimentos laboratoriais para os exames sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foram realizados no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses e as técnicas de PCR convencional junto ao Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia no Diagnóstico de Tuberculose e Doenças de Importância em Saúde Única, ambos no Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP-Botucatu, SP).

As técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) foram realizadas junto ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC-UNESP). O protocolo de Extração do DNA foi realizado no Instituto Adolfo Lutz (IAL), em Bauru, São Paulo. A Eletroforese em Gel de Agarose foi executada no laboratório de Doenças Tropicais da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) na Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP). A técnica de sequenciamento genético foi realizada em laboratório particular, localizado no mesmo município.

4.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*

Para a realização da técnica sorológica foram utilizados como antígenos formas promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa “Y”), mantidos em tubos rosqueados contendo 5 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 ml de meio NovyMacNeal- Nicolle (NNN), em estufa B.O.D. a 25ºC, repicados quinzenalmente, com protocolo descrito no Anexo VIII.

Para cada parasito, em capela de fluxo laminar, foi retirada uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes, repicados na semana anterior, colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40 vezes, para avaliação do crescimento das formas promastigotas em *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e as formas epimastigotas em *Trypanosoma cruzi*. Do tubo que apresentou parasitos com melhor motilidade e em maior quantidade, foi repicado 0,5 mL para três novos tubos de meio,

procedendo-se, assim, uma nova passagem. Os tubos foram mantidos em estufa a 25°C.

Após a verificação do crescimento de promastigotas e epimastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 ml do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foram adicionados de 2 a 3 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por mais três vezes. Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica, utilizando-se como antígeno quando se obteve de 20 a 30 parasitos por campo microscópico, em avaliação de 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm.

As lâminas de antígeno foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas das espécies do gênero *Leishmania* e o mesmo volume da suspensão de epimastigotas de *T. cruzi* em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20ºC, até o momento do uso, por um período máximo de duas semanas. Foi utilizado conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de cão e de gato, estabelecendo-se como triagem de animais positivos para *Leishmania* spp. um ponto de corte a partir do titulo 40 e para *T. cruzi*, a partir do título 20. A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966) com protocolo descrito no Anexo IX.

4.6 Exames moleculares

4.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA a partir das amostras de sangue foi realizada no Instituto Adolfo Lutz (IAL), em Bauru, SP, com o uso do Kit comercial Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen Scientific®, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante, cujo protocolo detalhado encontra-se no Anexo X.

4.6.2 Quantificação do DNA

Todas as amostras foram submetidas à quantificação do DNA, utilizando o aparelho Quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK, a fim de se verificar a quantidade de DNA em cada amostra. O protocolo para a quantificação do DNA encontra-se no Anexo XI.

4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) a partir de amostras de sangue para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*

Para a realização da cPCR cada tubo de reação de 0,2mL recebeu tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl2, 0,2mM de dNTPs, 1U de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,2μM de cada *primer*, 1μL da amostra testada e 8,3μL de água ultrapura (MIX-PCR), de forma que cada tubo apresentou 11μL do MIXPCR e 1μL de DNA extraído de cada uma das amostras de sangue. Inicialmente, foi realizada uma cPCR para amplificação de uma região conservada do gene constitutivo β-globulina para garantir a qualidade de amplificação do DNA extraído e a ausência de inibidores nas amostras, com a utilização dos *primers* β-1 e β-2, que amplificam a betaglobulina do DNA nuclear de vertebrados, e perfil de ciclagem de acordo com Edvinsson (2006), com modificações já realizadas com sucesso em nosso laboratório na avaliação da integridade do DNA extraído de outros mamíferos.

Para a pesquisa na família Trypanosomatidae foi realizada a amplificação da região SSU do rDNA, com a utilização dos *primers* V7-V8, segundo Noyes *et al*. (1999). Mais especificamente, para a pesquisa do gênero *Leishmania*, foi realizada a cPCR para a amplificação do kDNA de *Leishmania* (*L.*) *infantum*, com os *primers* LCH14/LCH15, segundo Silva *et al*. (2017a), uma vez que o cinetoplasto é um bom marcador para a detecção e identificação de parasitos do gênero *Leishmania*; além da amplificação do kDNA do complexo *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, onde foram utilizados os *primers* B1/B2, segundo De Bruijn e Barker (1992).

Para o gênero *Trypanosoma*, foi realizada a amplificação do kDNA de *T. cruzi*, utilizando-se os *primers* 121/122, segundo Viettri *et al*. (2018), com perfil de ciclagem adaptado em nosso laboratório (Tabela 2). Optamos pela utilização destes *primers* devido a sensibilidade e experiências anteriores no nosso laboratório com a padronização da técnica. As condições de amplificação em termociclador (AB Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) dos *primers* utilizados na pesquisa estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados e seus respectivos perfis de ciclagem.

Amplificação	***Primers***	**Ciclo**	**Referência**

β-globulina (β-1 e β-2)	β-1: 5'ACCACCAACTTCATCCACGTTCAC3' β-2: 5'CTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC3'	1x 95ºC - 50 min; 30x (95ºC - 30 s; 60ºC - 30 s; 72ºC - 30 s); 1x 72ºC - 5 min	Edvinsson, 2006.
Família Trypanosomatidae (V7-V8)	SSU561F: 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3' SSU561R: 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3'	30x (94°C - 30s; 54°C - 1 min; 72°C - 2 min)	Noyes *et al*., 1999.
Leishmania (*L.) infantum* (LCH14/LCH15)	LCH14: 5'CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG3' LCH15: 5'TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA3'	1x 94°c - 4 min; 40x (94°C - 30s; 59°C - 30s; 72°C – 30s); 1x 70°C - 10 min	Silva *et al*., 2017a.
Complexo *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis (B1/B2)	B1: 5'GGGGTTGGTGTAATATAGTGG3' B2: 5'CTAATTGTGCACGGGGAGG3'	1x 96°C - 6 min; 30x (93°C - 30s; 67°C - 1 min; 72°C - 1 min)	De Bruijn; Barker, 1992.
Trypanosoma cruzi (121/122)	121: 5'AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA3' 122: 5'GGGT TCGATTGGGGTTGGTGT3'	1x 94 ºC - 3min; 35x (94 ºC - 30s; 57 ºC - 30s; 72 ºC - 30s); 1x 72 ºC - 7min)	Viettri *et al*., 2018.

4.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização da amplificação dos produtos após a cPCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Sybr Safe® (Invitrogen) 0,1µL/ml. Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A voltagem utilizada foi de 100V por 50 minutos. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100bp DNA Ladder (Norgen), a fim de se comparar visualmente o tamanho dos fragmentos amplificados com os padrões de peso molecular das cepas utilizadas como controles positivos, utilizando-se do transiluminador Syngene. As corridas eletroforéticas foram realizadas no laboratório de Doenças Tropicais da Unidade de

Pesquisa Experimental (UNIPEX) na Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

4.6.5 Controles

Para o controle negativo foi utilizada a água mili-Q estéril, enquanto para os controles positivos foram usados os produtos da extração de DNA de cepas mantidas em meio NNN-LIT, sob cultivo em estufa B.O.D. a 25°C, repicadas quinzenalmente, das espécies *Leishmania* (*L.*) *infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *Trypanosoma cruzi* (Cepa “Y”).

4.6.6 Sequenciamento

As amostras amplificadas com o uso dos *primers* gerais para a família Trypanosomatidae foram sequenciadas, a fim de se identificar a espécie do parasito, enquanto as amostras amplificadas para os *primers* específicos foram sequenciadas visando confirmar o diagnóstico. O sequenciamento foi realizado em laboratório particular, localizado no município de Botucatu, SP. Os produtos amplificados foram purificados com o uso da Enzima ExoSap (GE) – USB ExoSap – IT® (USB Affymetrix, USA) na própria empresa. Após o sequenciamento, as sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal pelo Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0 para Windows (Kumar *et al*., 2016) e comparadas às sequências depositadas no banco de dados NCBI (BLAST).

4.6.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para a determinação da carga parasitária nas amostras de sangue dos animais utilizados foi realizada a qPCR, utilizando-se como alvo os *primers* TCZ1/TCZ2 para *T. cruzi,* segundo Virreira *et al*. (2003): (TCZ1) 5’CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT3’ e (TCZ2) 5’CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3’, responsáveis pela amplificação do DNA nuclear de *T. cruzi*; além dos *primers* Linf kDNA para *Leishmania infantum*, segundo Silva *et al*. (2016): (Linf kDNA-F) 5’GGCGTTCTGCAAAATCGGAAAA3’ e (Linf kDNA-R) 5’CCGATTTTTGGCATTTTTGGTCGAT3’, que amplificam o DNA do cinetoplasto de *L. infantum*. Foi analisada a curva de dissociação (*melting*) e feita a quantificação através de padrões de fluorescência. Foi utilizado o kit de reação GoTaq® qPCR

Master Mix SYBR® Green (Promega). As reações ocorreram em placas MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific).

Para a reação específica para *T. cruzi* cada cavidade de 0,1mL recebeu 3,4µL de água ultrapura, 10µL do reagente GoTaq® e 0,8µL de cada *primer*, assim, cada poço da placa continha 15µL de MIX-qPCR e 5µL da amostra extraída, totalizando 20µL. Já para a reação para *Leishmania* spp. cada poço de 0,1mL recebeu 4,8µL de água ultrapura, 10µL do reagente GoTaq® e 0,6µL de cada *primer*, onde cada poço apresentou 16µL de MIX-qPCR e 4µL da amostra extraída, resultando em 20µL.Todas as amostras foram testadas em duplicata na mesma placa. As placas passaram pelo processo de ciclagem e leitura por meio do equipamento AriaMx Real-Time PCR (qPCR) Instrumen (Agilent), com análise pelo software Agilent Aria Mx (2014-2019).

Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de cepas de *T. cruzi* (Cepa “Y”), *Leishmania* (*L.*) *infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906); *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). O perfil de ciclagem para a qPCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95ºC por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95ºC por 15s e 60ºC por 1 min, com a captura de sinais de fluorescência no final de cada ciclo, conforme recomendações do fabricante da Gotaq qPCR Master Mix. A curva de dissociação foi analisada em 95ºC por 30 segundos, seguido de 65°C por 30 segundos e 95ºC por 30 segundos, conforme padrão do equipamento.

4.7 Devolutivas às Unidades de Vigilância em Zoonoses

Após a realização de todos os testes diagnósticos, os resultados foram enviados para as UVZs (Anexo XII), contendo o diagnóstico de todos os animais para as zoonoses pesquisadas, acompanhados do seu nome, identificado durante a coleta e/ou número do microchip daqueles que possuíam, para que os médicos veterinários das UVZs pudessem tomar a conduta adequada e conhecer a situação epidemiológica do próprio município em relação às leishmanioses e doença de Chagas.

4.8 Georreferenciamento

Utilizando uma base de dados digital, a análise espacial foi realizada a partir do mapeamento dos municípios das instituições com amostras de sangue de cães ou gatos positivos para *Leishmania* spp. e/ou *T. cruzi* em pelo menos uma técnica diagnóstica, visando compreender espacialmente a distribuição de casos positivos na

área de estudo. Para isso, foi utilizado o instrumento de Sistema de Informação Geográfica (SIG), utilizando o software QGis 3.24.1.

4.9 Análise Estatística

As análises estatísticas descritivas foram calculadas usando o software Excel (Microsoft). O coeficiente Fleiss's Kappa foi calculado também pelo software Excel (Microsoft), utilizando em conjunto o Real Statistics Resource Pack para os cálculos estatísticos do presente estudo, construindo-se tabelas de contingência para se verificar a concordância entre os testes diagnósticos realizados.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Condições das Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZs)

5.1.1 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe

A UVZ de Peruíbe apresenta por volta de 60 animais, a maioria proveniente do abandono pelos moradores da cidade. Foi realizada a coleta de 31 amostras de sangue (20 cães e 11 gatos) (Tabela 3 do Anexo XIII). O local em que está funcionando apresenta espaço para os animais, com os cães separados individualmente em baias e os gatos em gatil telado (Figura 2). Além disso, a UVZ apresentava no momento das coletas aproximadamente 10 gatos diagnosticados para esporotricose, alocados em gaiolas separadas do restante dos animais, além de três animais com sinais clínicos não diagnosticados, dos quais um estava subnutrido, um apático e outro com feridas na pele. Os animais da UVZ não são imunizados contra a raiva, uma vez que, segundo a veterinária responsável, a rotatividade de animais é maior do que os recursos da unidade para vaciná-los. A prefeitura realiza campanhas de castração gratuitas, que são realizadas na própria UVZ.

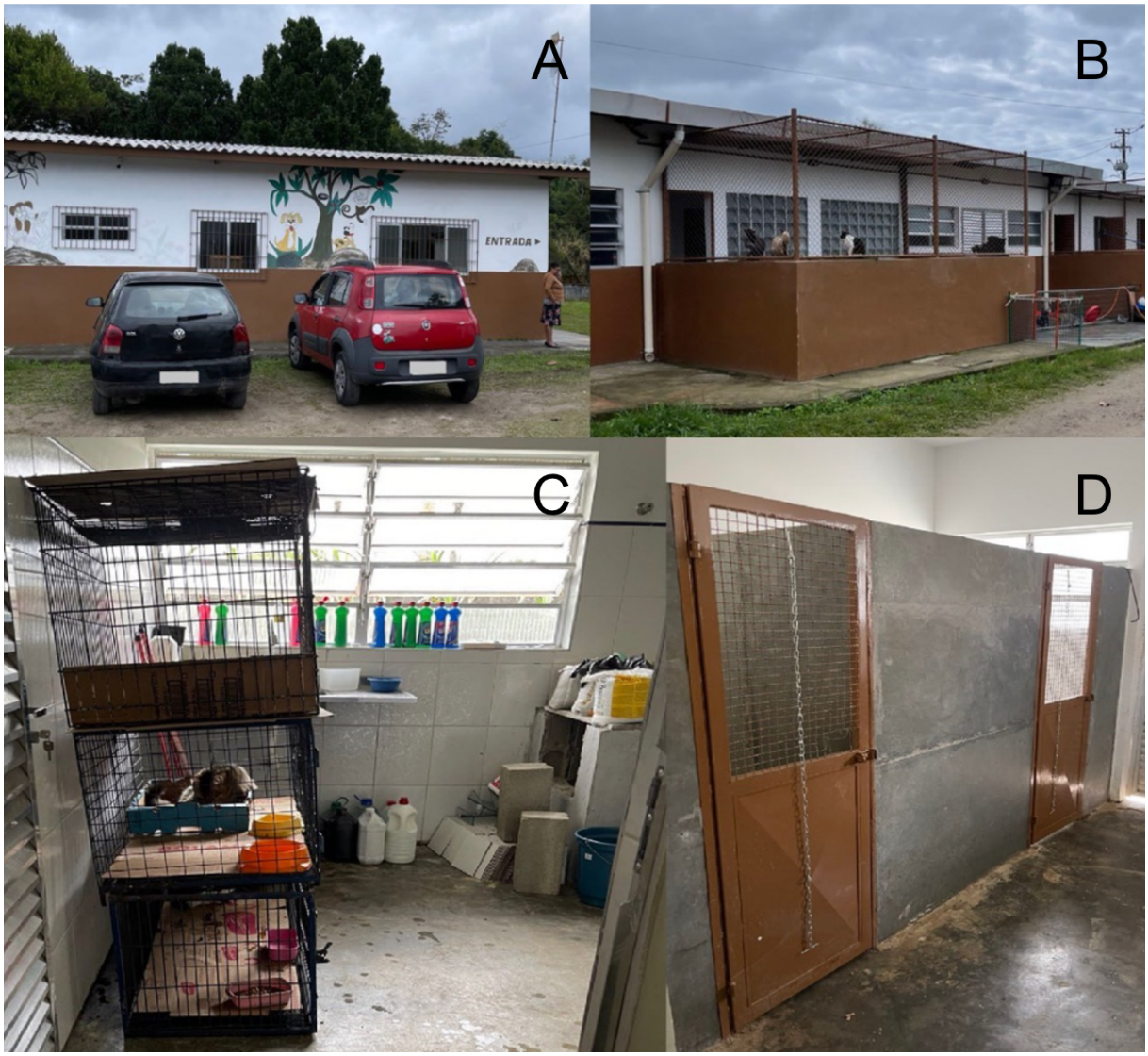


Figura 2. (A) Entrada da Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe, (B) parte externa do gatil, (C) gatos isolados com esporotricose e (D) baias individuais dos cães. Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.2 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Itanhaém

O município de Itanhaém apresenta dois canis. As amostras de sangue foram coletadas de um dos canis, que possuía oito cães, e o restante das amostras correspondem a gatos (Anexo XIV), cujo sangue foi coletado durante a campanha de castração gratuita (Figura 3). Todos os animais, dos canis e das campanhas receberam a vacina anti-rábica. Dois animais dos canis foram previamente diagnosticados com leptospirose, alocados em baias isoladas. Desta UVZ, foram

coletadas 31 amostras de sangue, das quais 8 amostras eram de cães e 23 amostras de gatos.

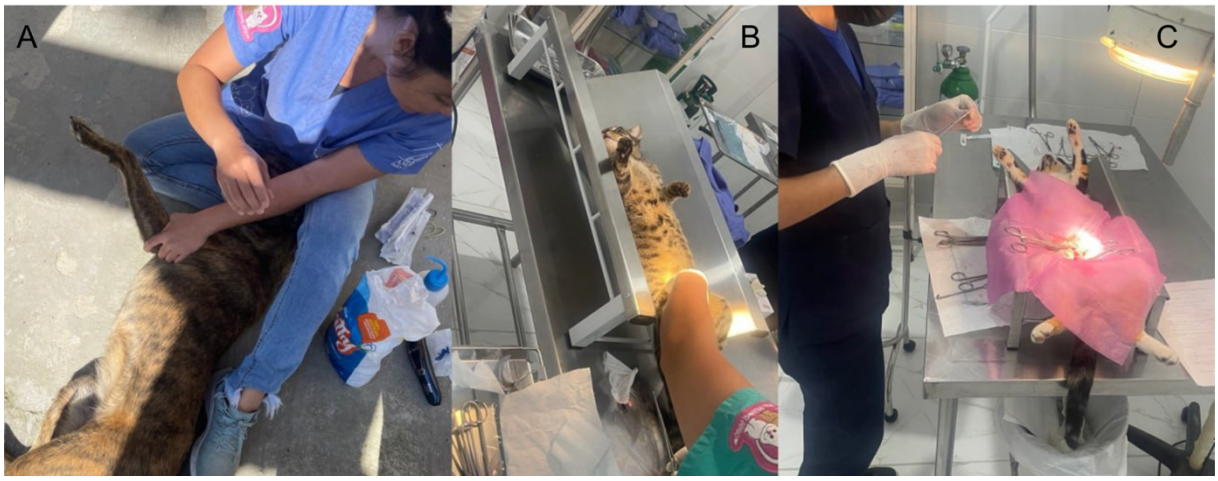


Figura 3. (A) Amostra de sangue coletada de um dos cães do canil e (B, C) castrações sendo realizadas. Fonte: arquivo pessoal.

5.1.3 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Mongaguá

O município de Mongaguá conta com uma UVZ recém reformada, que abriga aproximadamente 30 animais (Figura 4), todos vacinados contra a raiva. Neste local, foi possível a coleta de 21 amostras de sangue (Anexo XV). Destas, 20 amostras foram de cães e somente uma (01) de gato.



Figura 4. (A) Fachada da UVZ de Mongaguá, (B) coleta de sangue de um dos cães e (C) instalações do canil. Fonte: arquivo pessoal.

5.1.4 Unidade de Vigilância em Zoonoses do Guarujá

O município do Guarujá enfrenta grave problema de superlotação em seu canil. São aproximadamente 40 baias para mais de 200 animais, de forma que existem baias com até 15 cães, a maioria não vacinados, em condições de infraestrutura e sanitárias preocupantes (Figura 5), uma vez que não há funcionários suficientes para o funcionamento adequado da UVZ. Foram coletadas amostras de 30 cães (Anexo XVI), e não foi possível a coleta de nenhum gato, pois os que estavam presentes na UVZ apresentam difícil manejo e muitos encontravam-se com esporotricose. Além dos gatos em tratamento que estavam isolados nas baias, outros gatos saudáveis

estavam soltos pela UVZ com acesso à rua, dificultando a captura para a coleta. Três cães eram positivos para leptospirose e encontravam-se em baias isoladas dos outros animais, além de outros três cães com sinais como onicogrifose e apatia, considerados suspeitos para leishmaniose, que não estavam isolados dos demais.



Figura 5. (A) Fachada da UVZ do Guarujá, (B, D) baias dos cães, (C) coleta de sangue de um dos cães, (E) gaiolas dos gatos com esporotricose e (F) espaço destinado aos gatos saudáveis, que possuem acesso a rua. Fonte: arquivo pessoal.

5.1.5 Unidade de Vigilância em Zoonoses de São Sebastião

A UVZ de São Sebastião encontra-se em prédio novo, possuindo boa infraestrutura e recebe destaque por ter cinco médicos veterinários à disposição da UVZ. Conforme mostra a Figura 6, foram coletadas amostras de sangue de 21 animais (Anexo XVII), das quais 17 foram amostras de cães e quatro (04) de gatos. Todos animais eram vacinados contra a raiva. Dois animais encontravam-se em tratamento para cinomose, apresentando sinais da doença; além de um animal com suspeita de leishmaniose.



Figura 6. (A, B) Coleta de sangue de dois cães da UVZ de São Sebastião, por um dos médicos veterinários responsáveis pela unidade. Fonte: arquivo pessoal.

5.1.6 Unidade de Vigilância em Zoonoses de Ubatuba

A UVZ de Ubatuba encontra-se próxima à serra, cercada de muita vegetação. Os cães encontram-se em baias com no máximo dois animais, enquanto os gatos encontram-se soltos pela unidade (Figura 7). Apresenta aproximadamente 40 animais, todos vacinados contra a raiva. Nesta unidade, foi possível a coleta de 27 amostras, 20 obtidas de cães e sete (07) de gatos (Anexo XVIII).

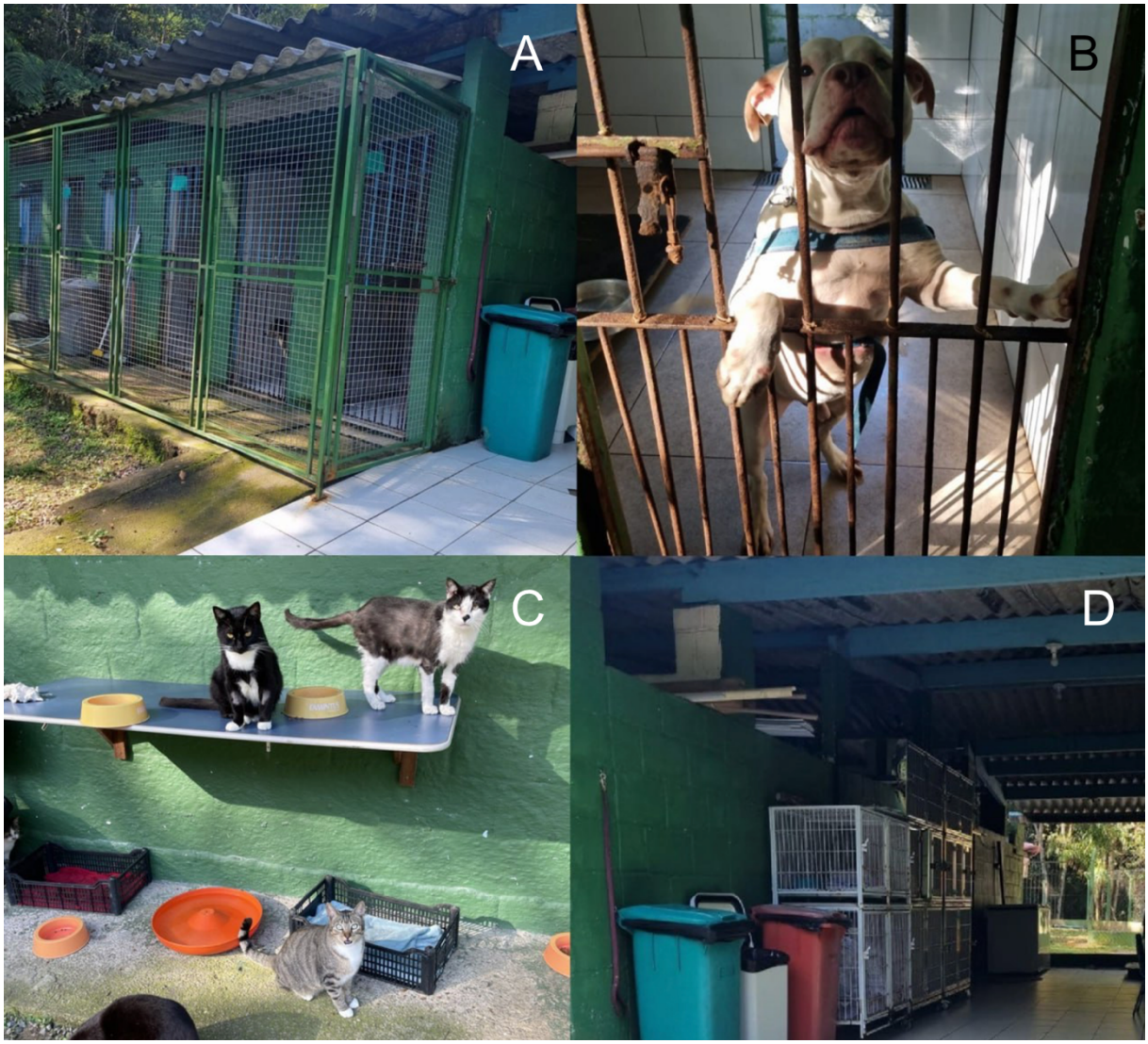


Figura 7. (A, B) Baias da UVZ de Ubatuba, (C) gatos soltos e (D) gaiolas para gatos em tratamento. Fonte: arquivo pessoal.

5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*

Todos os cães e gatos foram negativos para a RIFI para *Leishmania* spp. Na RIFI para *Trypanosoma cruzi*, três (03) animais apresentaram amostras reagentes na triagem (título 20); entretanto, após a realização das diluições seguintes estas não apresentaram nenhuma fluorescência, das quais as amostras 13G e 14G, do município do Guarujá, diagnosticadas com leptospirose, e a amostra 16G do mesmo município, que apresentava suspeita de leishmaniose.

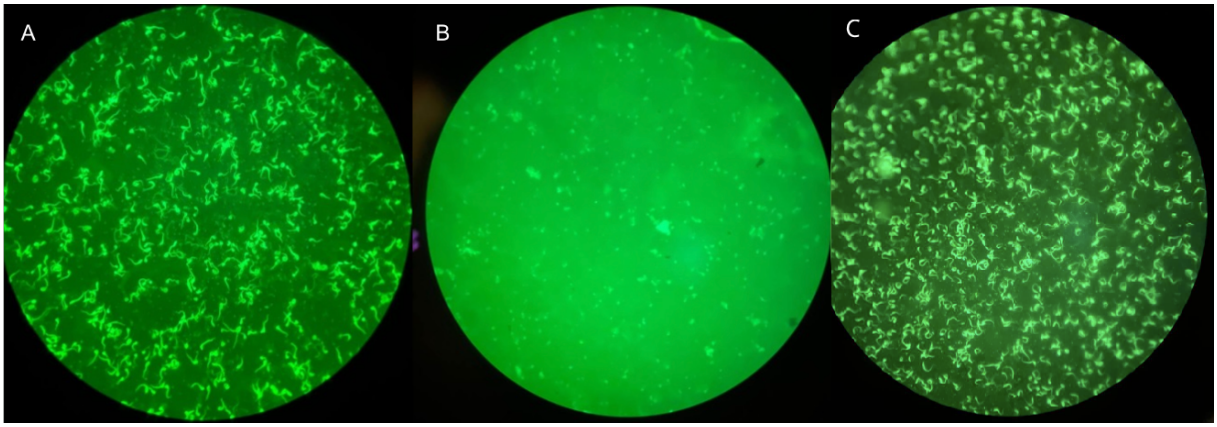


Figura 8. (A) Controle positivo utilizado na RIFI, (B) Amostras não reagente e (C) amostra reagente para *Trypanosoma cruzi* com título 20. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 9. Aluna realizando a leitura das lâminas de RIFI.
Fonte: arquivo pessoal.

5.3 Exames Moleculares

5.3.1 Quantificação do DNA

Após a extração do DNA, 157 amostras de sangue foram quantificadas, validando o funcionamento do protocolo de extração. Não foi possível a extração de quatro amostras (uma amostra do município do Guarujá e de três amostras de São Sebastião). A concentração de DNA em cada uma das amostras da pesquisa encontra-se na Tabela 9 do Anexo XIX. A amostra com maior concentração de DNA apresentou 211 µg/mL e a menor concentração foi de 0,3 µg/mL, com média de amostras 16,25 µg/mL. Em relação pureza da amostra, demonstrada pela relação A260/280, a menor razão foi de 0,176 e a maior foi de 5,111, apresentando média de 1,5, indicando excesso de proteínas no DNA extraído.

5.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* e Eletroforese em Gel de Agarose

5.3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* β-1 e β-2 (140pb)

Os *primers* β-1 e β-2 foram utilizados para a amplificação do gene de β-globulina para garantir a qualidade de amplificação do DNA extraído. Todas as amostras foram corretamente extraídas e amplificaram na eletroforese (Figura 10).

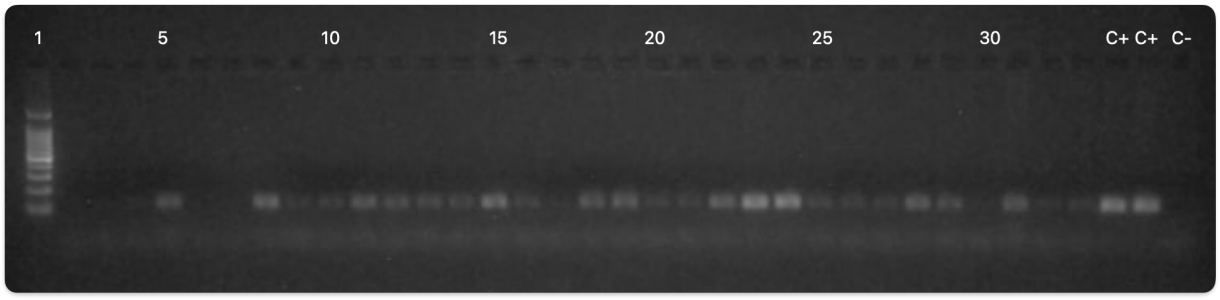


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores β-1 e β-2 (140pb) para verificar a qualidade de amplificação do DNA extraído. Marcador de peso molecular 100pb; colunas 34 e 35 – controles positivos; 36 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.

5.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para a família Trypanosomatidae – V7/V8 – 561F/561R (700pb)

Foi realizada a corrida eletroforética das 161 amostras de cães e gatos, das quais todas negativas para a família Trypanosomatidae com o uso dos *primers* 561F/561R (Figura 11).

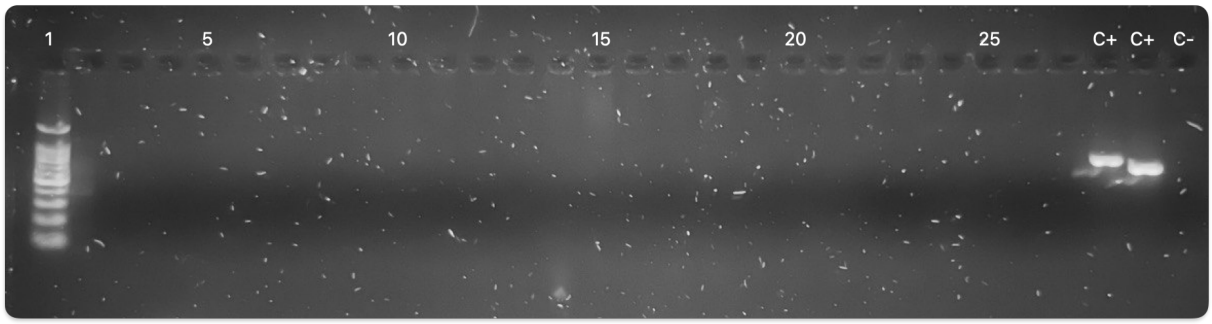


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 561F e 561R (700pb) para a família Trypanosomatidae. Marcador de peso molecular 100pb; coluna 28 - controle positivo (*Leishmania infantum*); 29 - controle positivo (*Trypanosoma cruzi*); 30 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.

5.3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* LCH14/LCH15 (*Leishmania infantum*) (167pb)

A Reação em Cadeia da Polimerase para os *primers* LCH14/LCH15, que amplificam o kDNA de *Leishmania* (*L.*) *infantum*, apresentou uma amostra amplificada (Figura 12), correspondente a amostra 6P, do município de Peruíbe, um cão macho, filhote, que durante a coleta das amostras não apresentava nenhum sinal clínico. A amostra foi enviada para sequenciamento genético, cujo resultado será apresentado no item 5.3.3.

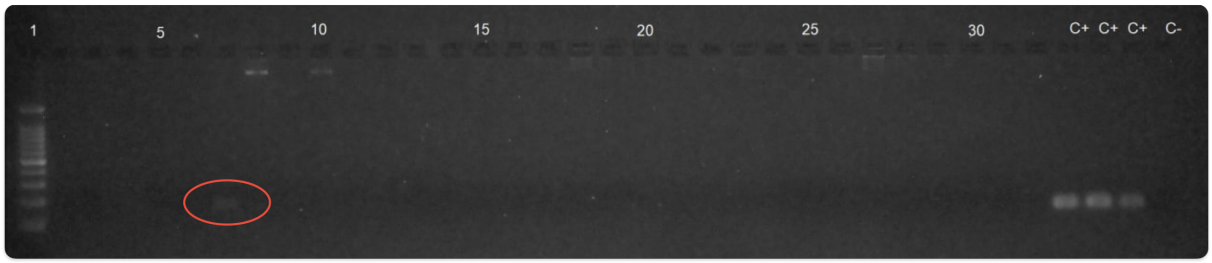


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores LCH14 e LCH15 (167pb) para a espécie *Leishmania* (*L.*) *infantum*. Marcador de peso molecular 100pb; coluna 7 – amostra 6P amplificada; colunas 33, 34 e 35 - controles positivos (*Leishmania infantum*)*;* 36 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.

5.3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* 121/122 (*Trypanosoma cruzi*) (350pb)

A Reação em Cadeia da Polimerase convencional com os iniciadores 121/122 para as 161 amostras de sangue não apresentou amplificação (Figura 13).

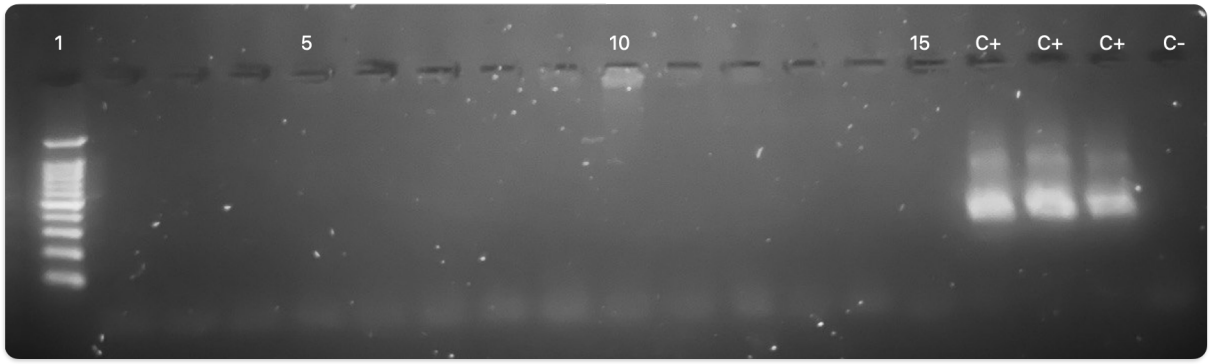


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores 121 e 122 (350pb) para a espécie *Trypanosoma cruzi*. Marcador de peso molecular 100pb; colunas 16, 17 e 18 - controles positivos (*Trypanosoma cruzi*); 19 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.

5.3.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Corrida Eletroforética para os *primers* B1/B2 (*Leishmania braziliensis*) (800pb)

As amostras testadas para os iniciadores B1/B2, que amplificam o kDNA do complexo *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, apresentaram-se todas negativas.

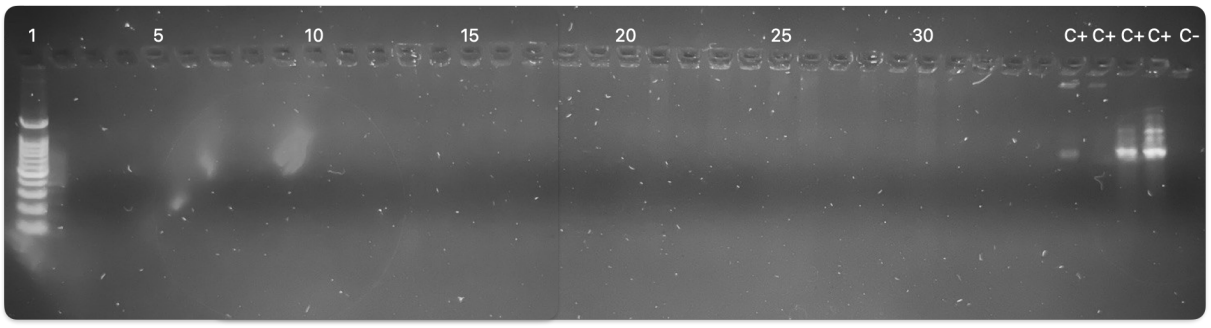


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% para os iniciadores B1 e B2 (800pb) para a espécie *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. Marcador de peso molecular 100pb. Colunas 35, 36, 37 e 38 - controle positivo (*Leishmania braziliensis*); 39 - controle negativo (água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.

5.3.3 Sequenciamento Genético

A amostra 6P, amplificada para os *primers* LCH14/LCH15 foi enviada para o sequenciamento genético. Entretanto, após duas tentativas de envio, a amostra se mostrou inadequada para o sequenciamento, devido ao nível de degradação do DNA.

5.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Os testes para a qPCR foram iniciados com a validação das concentrações de *primers*, quantidade de DNA da amostra, e curvas-padrão dos controles positivos, obtendo assim uma quantificação e curva de dissociação precisas. Dessa forma, os *primers*, originalmente liofilizados, foram diluídos a uma concentração final de 10µM. Para determinar a quantidade mais adequada de *primer* por reação foram testadas as concentrações de 0,2µM, 0,4µM, 0,6µM e 0,8µM, uma vez que as instruções do reagente GoTaq® PCR Master Mix SYBR® Green sugerem uma concentração de *primer* de 0,2-1µM por reação.

Além disso, também foi testada a quantidade adequada de DNA por reação, utilizando-se, portanto, 3µL, 4µL e 5µL, a fim de observar a melhor curva de amplificação e dissociação dos amplicons, ambos os testes realizados com cada par de *primers* e os controles positivos de *T. cruzi* e *L. infantum*.

Após a realização dos testes foi confirmado o funcionamento dos *primers* e dos controles, uma vez que todos apresentaram curva de amplificação, enquanto os controles negativos permaneceram sem contaminação. Neste teste, foi observado que os controles que apresentaram melhor sensibilidade, apresentando consequentemente o menor Ct, foram submetidos a reação com 0,8µL de *primer*, com 5µL de DNA para *T. cruzi*, e 0,6µL de *primer,* com 4µL de DNA para *Leishmania* spp.

Em relação a especificidade dos *primers*, observada na curva de dissociação, foi possível observar que os mesmos amplificaram um produto único, para *T. cruzi* com uma temperatura de *melting* (Tm) variando de 81,5ºC a 82,5ºC, e para *L. infantum* com uma temperatura de *melting* (Tm) variando de 67ºC a 68ºC.

Após a padronização, a eficiência da reação foi determinada por construção de uma curva padrão. Para isso, foram utilizados os controles positivos para *T. cruzi* e *L. infantum*, obtendo uma diluição seriada na razão 1:10, partindo do ponto mais concentrado até o ponto 10^{-6}. A eficiência observada foi de 85,66%. Ainda, foi determinado como ponto de corte para as amostras positivas o Ct de 33, possibilitando que as amostras fossem submetidas a qPCR.

Para os *primers* TCZ1/TCZ2, das 157 amostras testadas, 151 apresentaram amplificação, pertencentes a 108 cães e 43 gatos, porém 51/157 (32,48%) foram positivas para *T. cruzi*, apresentando Ct menor ou igual a 33, das quais 26/51 (50,98%) amostras positivas de gatos e 25/51 (49,02%) de cães (Anexo XX). O gráfico da curva de amplificação obtido na reação de qPCR das amostras positivas está apresentado nas Figuras 15, 16 e 17, e o gráfico da curva de dissociação das mesmas amostras encontram-se nas Figuras 18, 19 e 20.

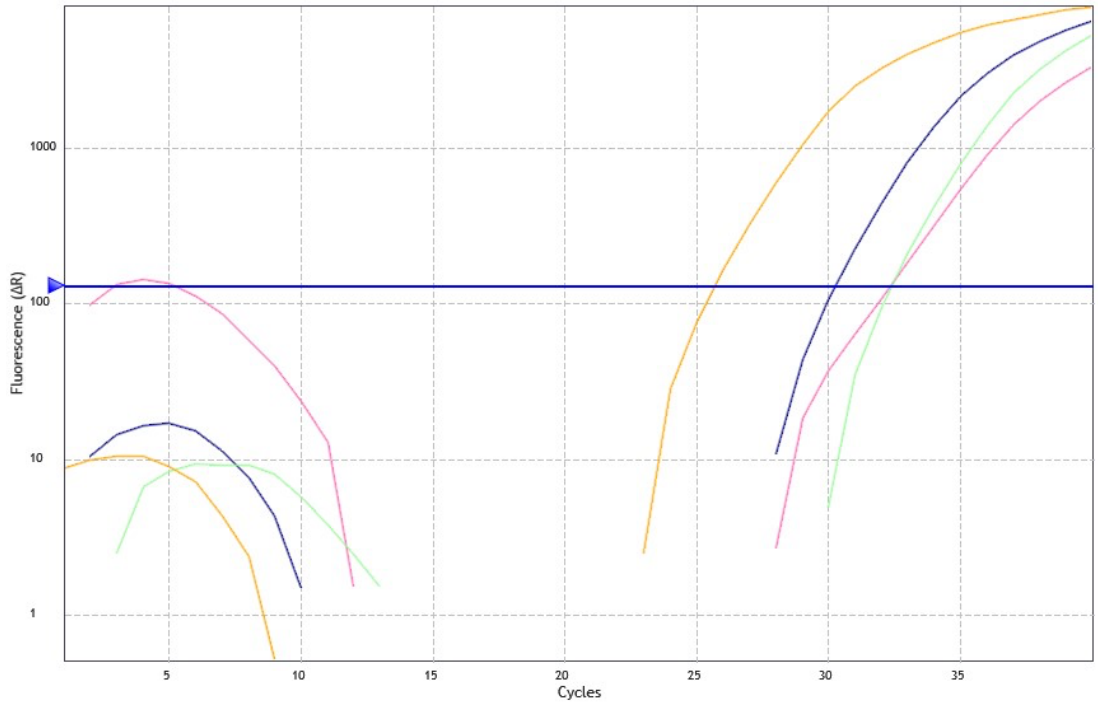


Figura 15. Gráfico da curva de amplificação de amostras de sangue de cães (2I, 3I e 4I), procedentes da Unidade de Vigilância de Zoonoses de Itanhaém, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.

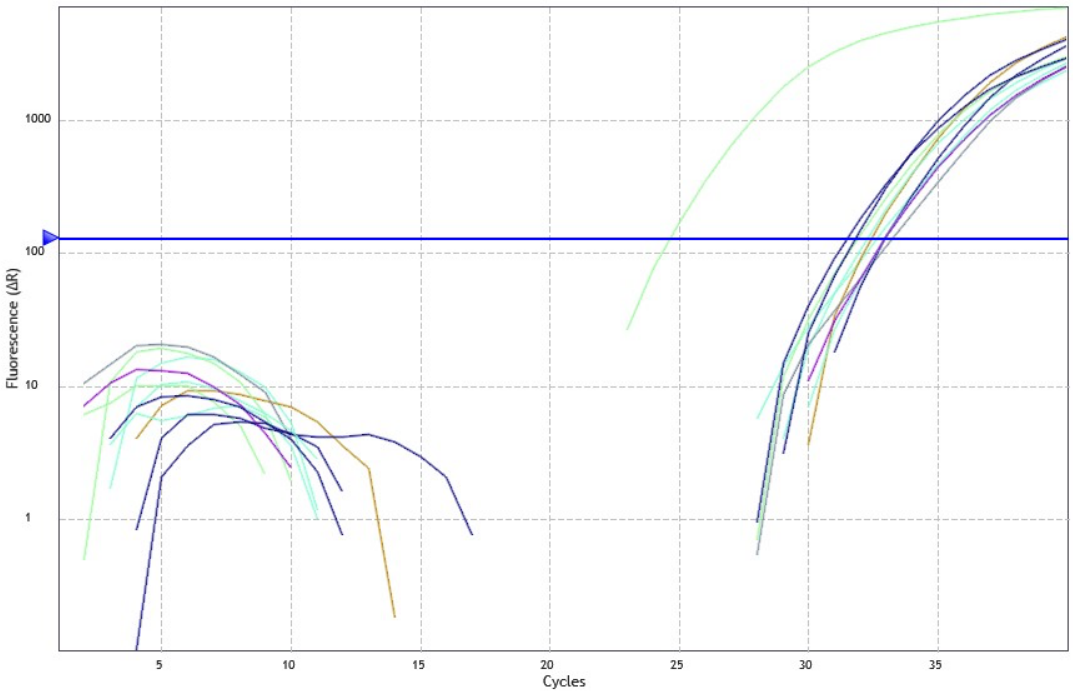


Figura 16. Gráfico da curva de amplificação de amostras de sangue de cães (7M, 8M, 13M, 18M. 19M. 20M, 21M, 2U, 3U, 25U), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Mongaguá e Ubatuba, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.

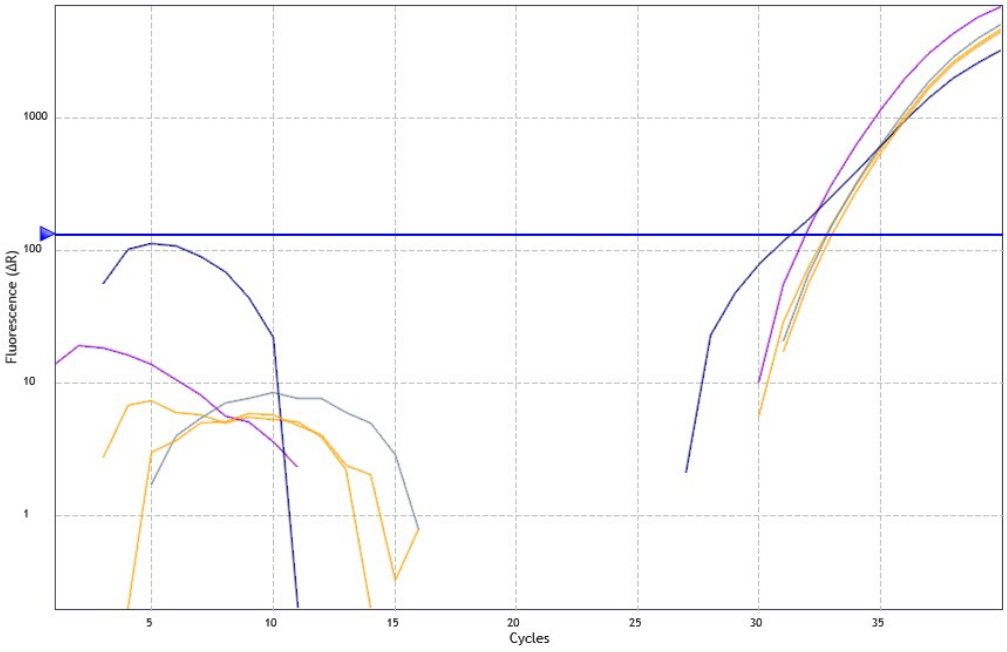


Figura 17. Gráfico da curva de amplificação de amostras de sangue de cães (9P, 23P, 26P e 4G), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Peruíbe e Guarujá, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.

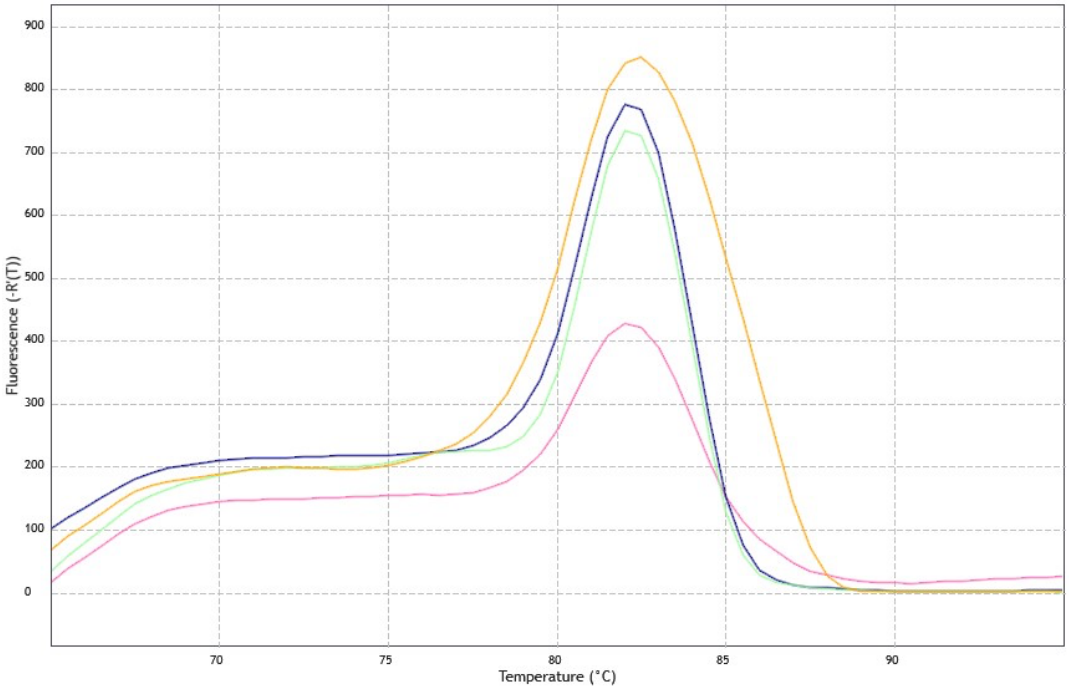


Figura 18. Gráfico da curva de dissociação de amostras de sangue de cães (2I, 3I e 4I) procedentes da Unidade de Vigilância de Zoonoses de Itanhaém, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.

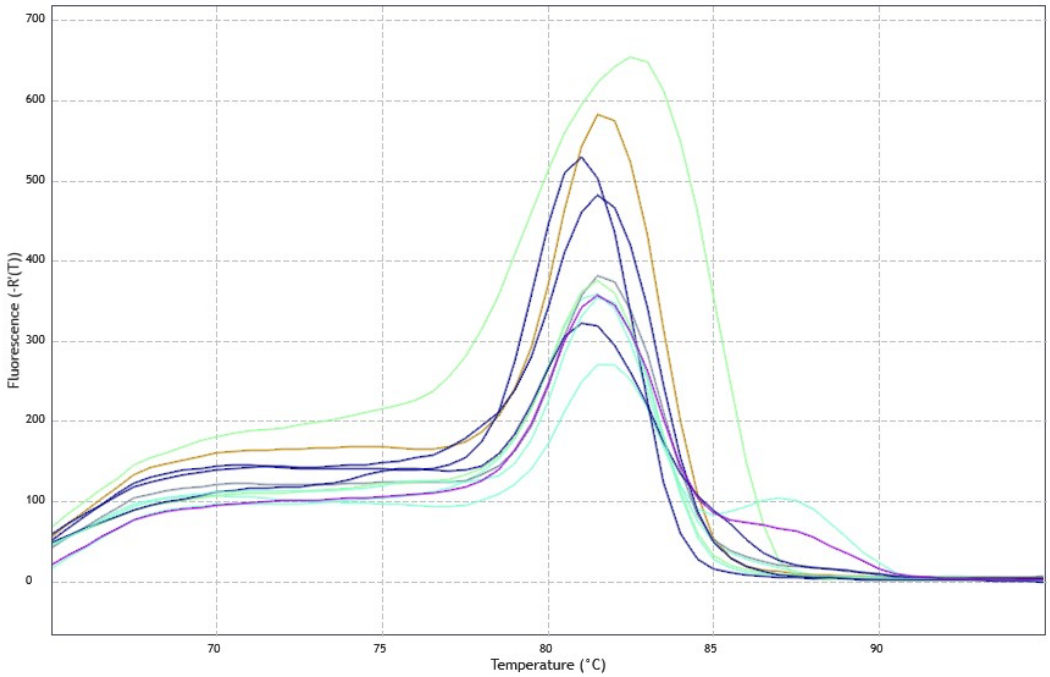


Figura 19. Gráfico da curva de dissociação de amostras de sangue de cães (7M, 8M, 13M, 18M. 19M. 20M, 21M, 2U, 3U, 25U), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Mongaguá e Ubatuba, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.

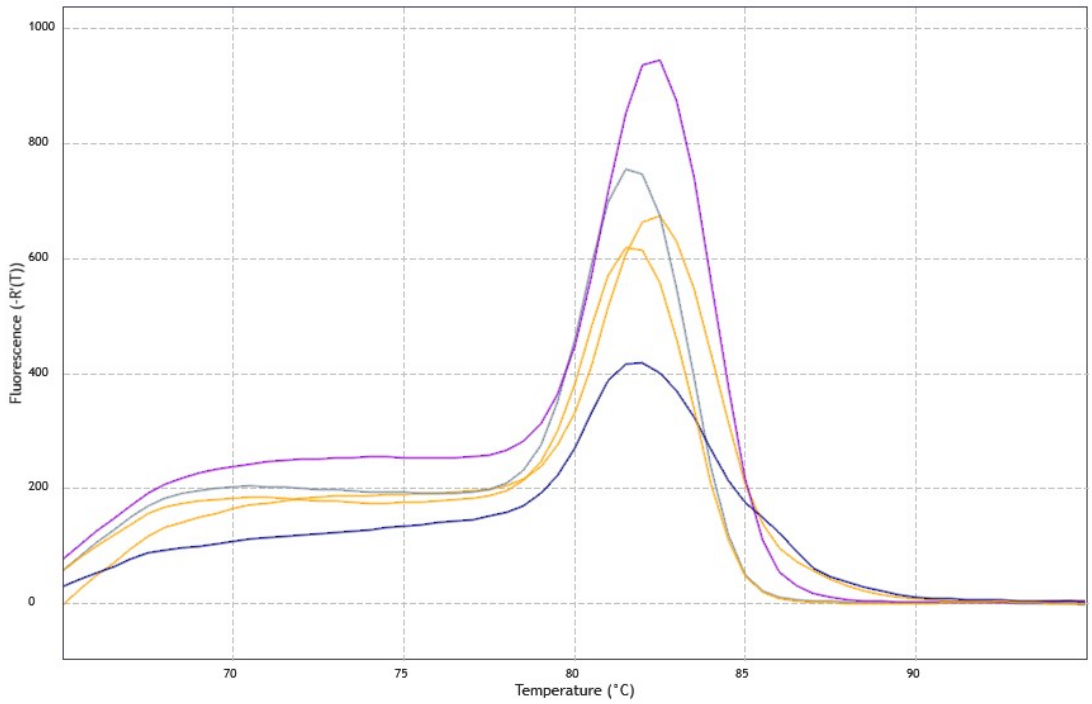


Figura 20. Gráfico da curva de dissociação de amostras de sangue de cães (9P, 23P, 26P e 4G), procedentes das Unidades de Vigilância de Zoonoses de Peruíbe e Guarujá, positivas para *Trypanosoma cruzi* e controle positivo. Fonte: arquivo pessoal.

Para os *primers* Linf kDNA, das 157 amostras testadas, 19 apresentaram amplificação, onde 15 amostras foram de cães e 4 de gatos, porém nenhuma amostra foi considerada positiva, uma vez que todos os valores de Ct foram acima de 33. O gráfico da curva de amplificação obtido na reação de qPCR do controle positivo para *L. infantum* e sua curva de dissociação estão apresentados nas Figuras 21 e 22.

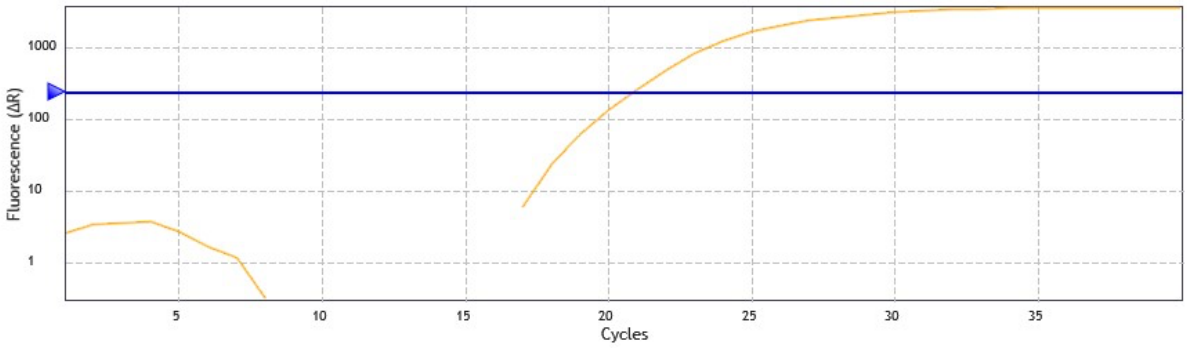


Figura 21. Gráfico da curva de amplificação do controle positivo para *Leishmania infantum*. Fonte: arquivo pessoal.

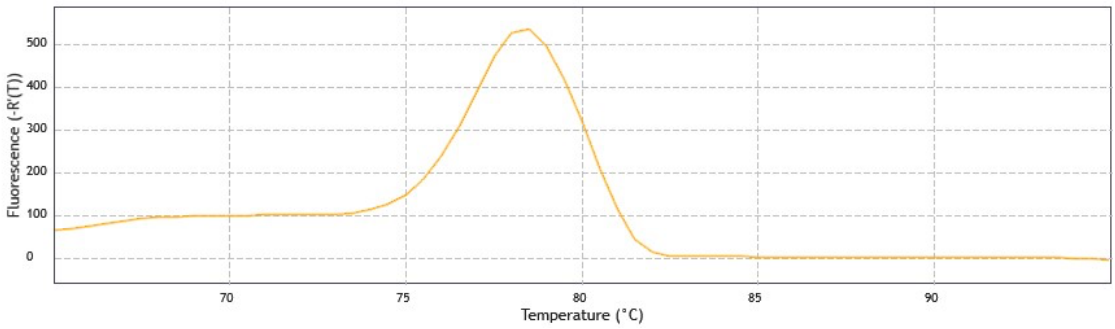


Figura 22. Gráfico da curva de dissociação do controle positivo para *Leishmania infantum*. Fonte: arquivo pessoal.

5.4 Georreferenciamento

Foi realizada a análise espacial dos municípios cujos cães e gatos das Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs) foram testados e em quais municípios foi possível a detecção de *T. cruzi* ou *Leishmania* spp. no sangue em cada um dos métodos diagnósticos. Foi observada a positividade para *T. cruzi* em todos os municípios estudados, enquanto apenas um município apresentou positividade para *L. infantum*. Os mapas com as localizações geográficas estão apresentados a seguir.

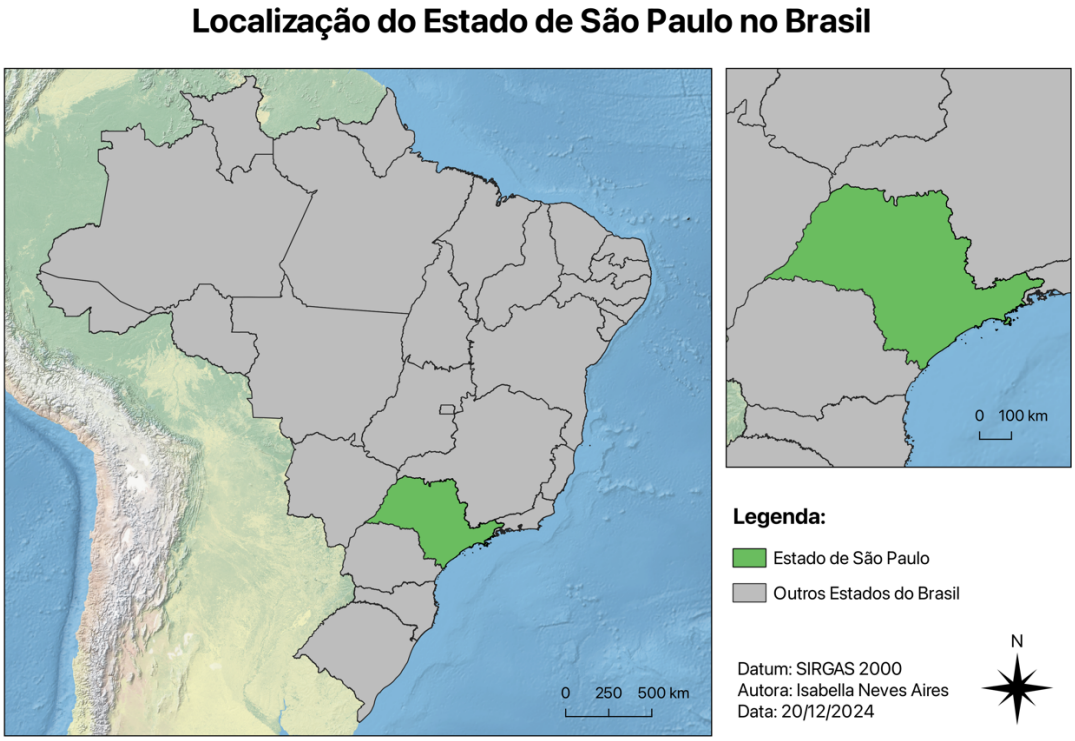


Figura 23. Mapa da localização do Estado de São Paulo no Brasil. Fonte: QGis.

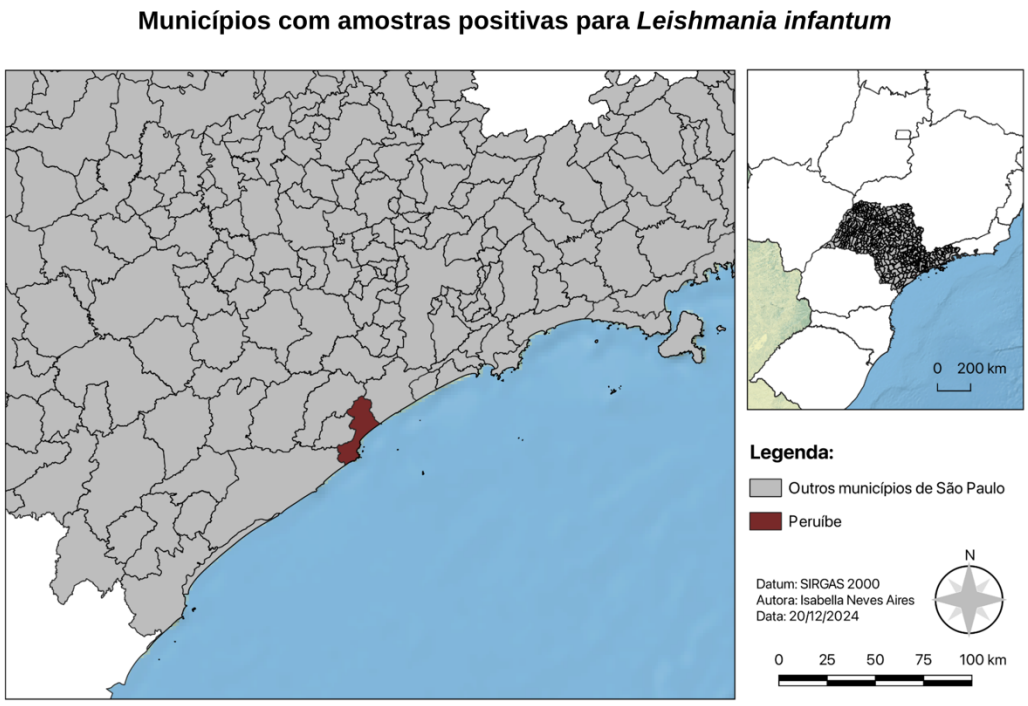


Figura 24. Mapa do município de Peruíbe, que apresentou uma amostra de sangue de cão positiva para *Leishmania infantum*. Fonte: QGis.

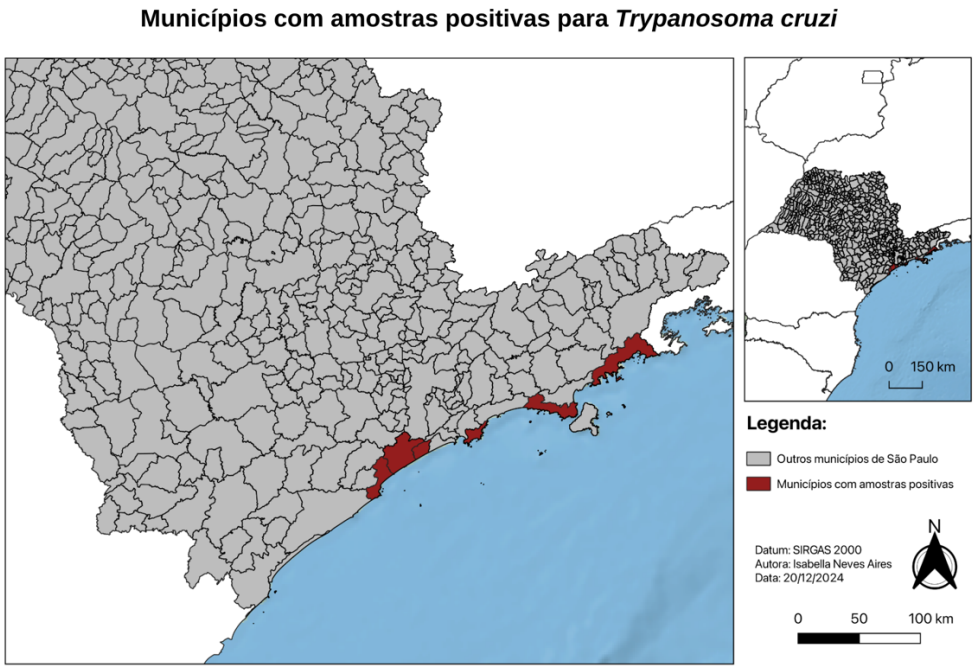


Figura 25. Mapa dos municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Guarujá, São Sebastião e Ubatuba, que apresentaram amostras de sangue de cães e gatos positivas para *Trypanosoma cruzi*. Fonte: QGis.

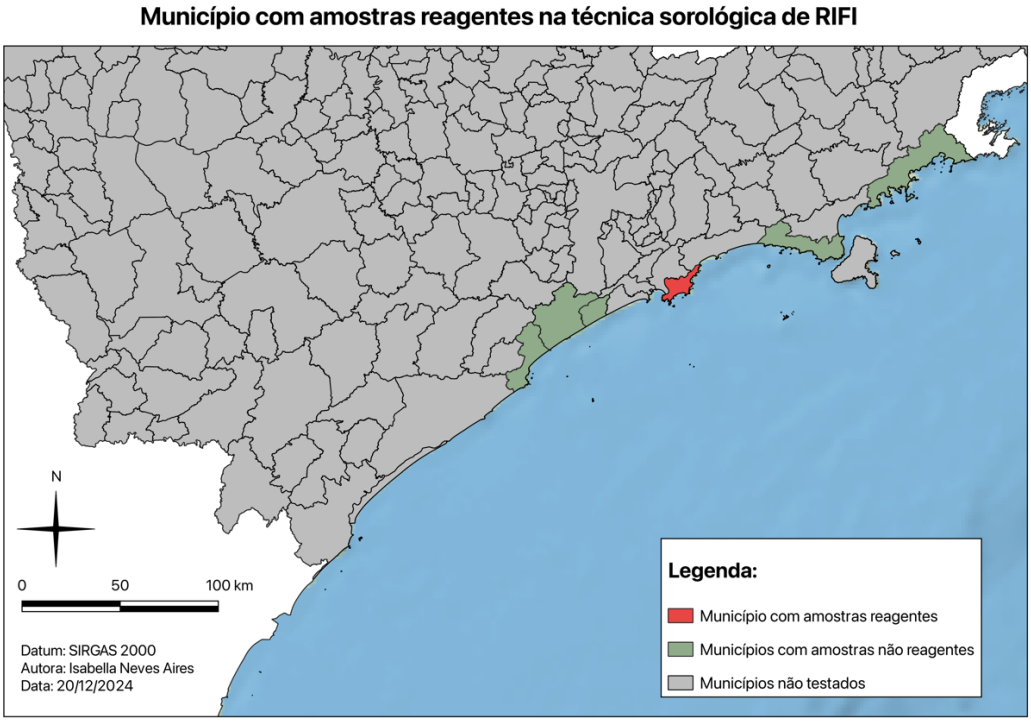


Figura 26. Mapa indicando o município de Guarujá, que apresentou amostras de sangue de cães reagentes para a técnica sorológica de RIFI para *Trypanosoma cruzi*. Destaca-se em vermelho o município de Guarujá e em verde, os municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, São Sebastião e Ubatuba. Fonte: QGis.

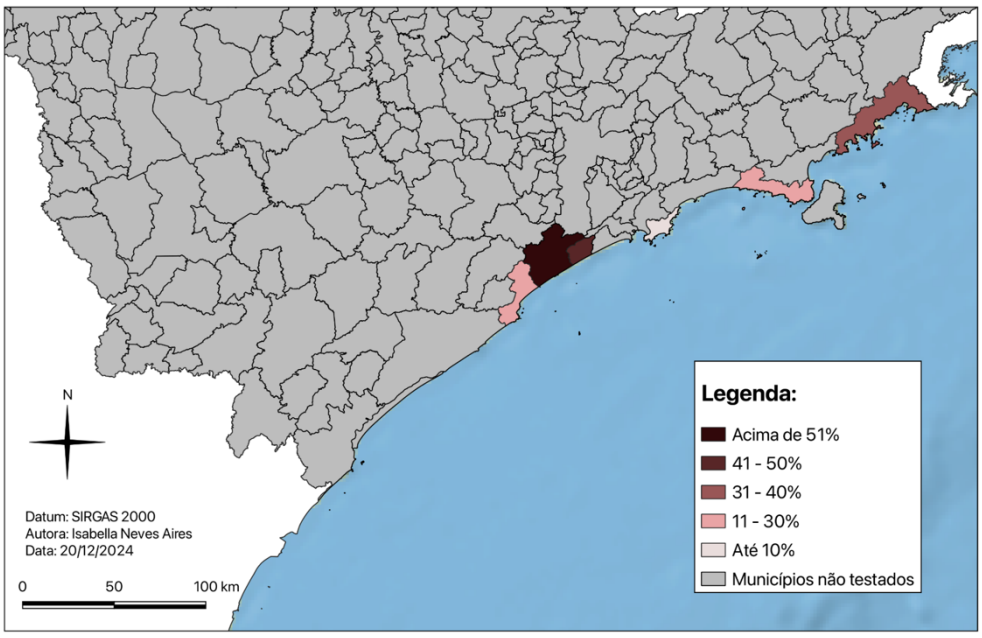


Figura 27. Mapa com a porcentagem de amostras positivas na qPCR para *Trypanosoma cruzi* por município. Fonte: QGis.

5.5 Análise Estatística

Analisando os dados obtidos no estudo, obteve-se a a relação de amostras por município, indicada no Gráfico 1 abaixo.

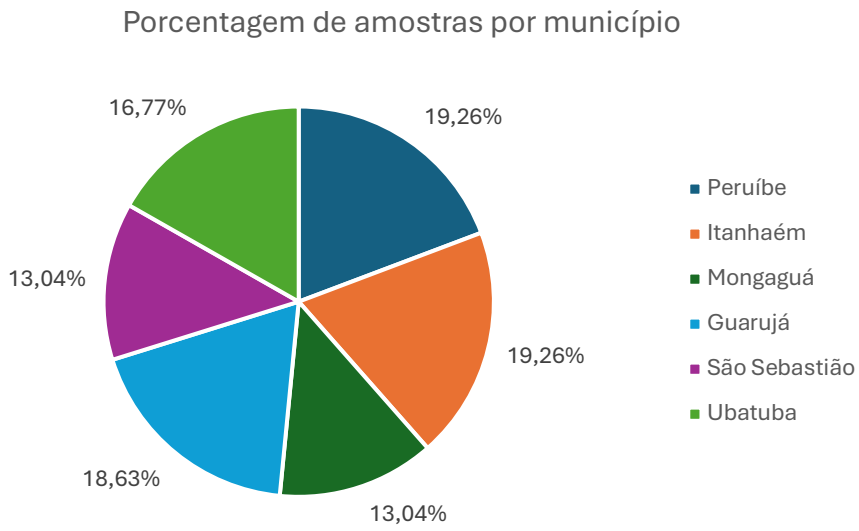


Gráfico 1. Porcentagem de amostras testadas na pesquisa separadas por município.

Das 161 amostras coletadas, 3 amostras foram reagentes para *T. cruzi* na sorologia (1,86%). Destas, a extração do DNA foi possível em 157 amostras (97,51%), possibilitando os testes moleculares. Na cPCR, apenas uma amostra das 157 testadas foi amplificada para *L. infantum* (0,64%). Enquanto na qPCR, 19 das 157 amostras apresentaram curva de amplificação para *Leishmania* spp. (12,1%), 15/19 amostras de cães (78,95%) e 4/19 de gatos (21,05%), porém todas foram negativas por apresentarem o Ct maior que 33, ponto de corte estabelecido na reação. Em relação a qPCR para *T. cruzi*, das 157 amostras testadas, 151 apresentaram alguma amplificação (96,18%), pertencentes a 108/151 cães (71,52%) e 43/151 gatos (28,48%). Destas, 51/157 amostras foram positivas (32,48%), de 25/51 cães (49%) e 26/51 gatos (51%), de forma que somente seis (06) amostras de 157 (3,82%) não tiveram nenhum contato com o parasito, conforme ilustra o Gráfico 2 abaixo.

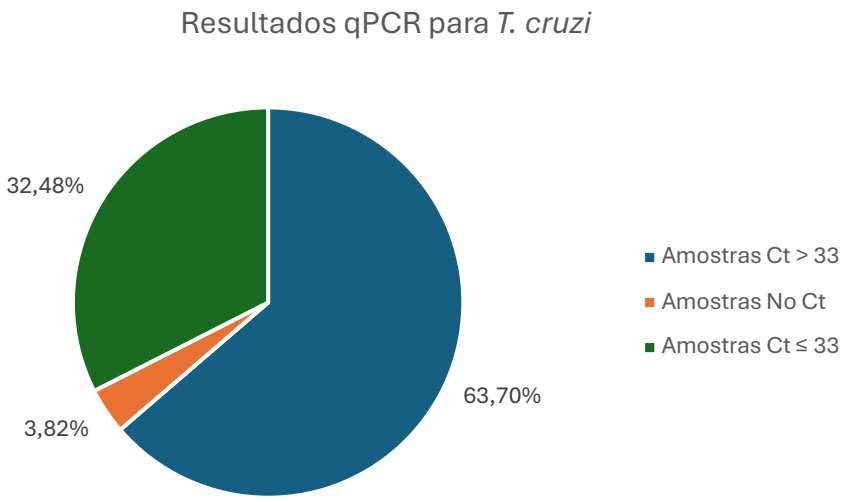


Gráfico 2. Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue de cães e gatos procedentes de Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZs) do litoral do Estado de São Paulo.

A positividade por espécie na qPCR para *Trypanosoma cruzi* foi mais significativa nos gatos, uma vez que, das 43 amostras testadas, 26 foram positivas (60,46%), enquanto dos 108 cães diagnosticados, 25 foram positivas (23,15%). O município de Itanhaém apresentou o maior número de animais positivos aos testes moleculares, com 3/51 cães (5,88%) e 14/51 gatos (27,45%), seguido pelos municípios de Mongaguá, com 8/51 cães (15,69%) e 1/51 gato (1,96%) e Ubatuba, com 3/51 cães (5,88%) e 6/51 gatos (11,76%). Ainda, Peruíbe, com 4/51 cães (7,84%) e 4/51 gatos (7,84%), São Sebastião, com 4/51 cães (7,84%) e 1/51 gato (1,96%) e Guarujá, com somente três de 51 cães positivos à qPCR (5,88%).

À sorologia, o único município que apresentou amostras reagentes na técnica da RIFI foi o Guarujá, com três (03) amostras reagentes para *T. cruzi,* das 30 amostras testadas neste município, correspondendo a 10%. Para a cPCR, somente o município de Peruíbe apresentou uma amostra amplificada para *L. infantum*, das 31 amostras testadas para o município, o equivalente a 3,22%.

Em relação a qPCR, todos os municípios apresentaram amostras positivas, correspondendo a 25,81% de 31 de amostras do município de Peruíbe; 54,83% das 31 amostras testadas em Itanhaém; 42,86% de 21 em Mongaguá; 10,34% das 29 amostras testadas para o município do Guarujá; 27,78% de amostras positivas de 18 amostras da cidade de São Sebastião; e 33,33% de 27 do total testado em Ubatuba.

O Gráfico 3 ilustra a porcentagem de amostras positivas por município, das 51 amostras cujo Ct foi menor ou igual a 33 para *Trypanosoma cruzi*.

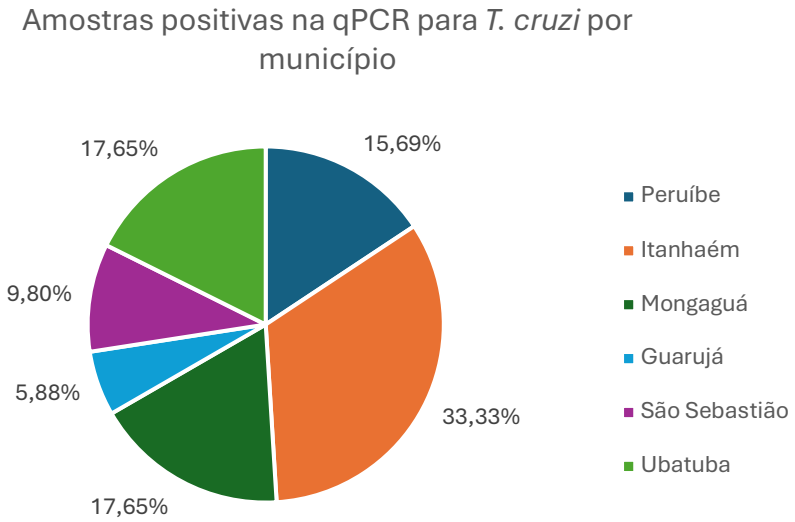


Gráfico 3. Amostras positivas para *Trypanosoma cruzi* na Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real por município.

Foram construídas tabelas de contingência e calculados o coeficiente Fleiss's Kappa foi calculado pelo software Excel (Microsoft), utilizando em conjunto o Real Statistics Resource Pack para os cálculos estatísticos do presente estudo, elaborando-se tabelas de contingência para se verificar a concordância entre os testes diagnósticos realizados. Entretanto, por se tratar de relação de concordância entre dois métodos diagnósticos e devido aos resultados de cada técnica utilizada apresentarem grandes diferenças, foi possível a realização do coeficiente Fleiss's Kappa apenas entre a técnica de sorologia da RIFI e a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, ambas para *T. cruzi*. A Tabela 11 mostra os valores obtidos.

Tabela 11. Cálculo do coeficiente de Fleiss's Kappa para a relação entre a RIFI e a qPCR para *Trypanosoma cruzi*.

	Positivo	**Negativo**	**Total**
Diagnóstico para a qPCR	51	106	157
Diagnóstico para a sorologia	3	158	161
Coeficiente Kappa	- 0,0374		
IC Inferior	- 0,0785		

IC Superior	0,0036

Em relação aos resultados estatísticos obtidos para todas as amostras, o resultado do coeficiente Kappa foi de K = - 0,0374. Segundo a interpretação dos valores Kappa (Tabela 12), este apresentou ausência de concordância entre os testes comparados.

Tabela 12. Interpretação do nível de concordância dos valores Kappa.

Valores do Kappa	Interpretação
< 0	Ausência de concordância
0 – 0,19	Concordância pobre
0,20 – 0,39	Concordância leve
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substantiva
0,80 – 1,00	Concordância quase perfeita

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Diagnóstico dos Animais Testados

Os resultados sorológicos indicam três possíveis infecções por *Trypanosoma cruzi* no município do Guarujá, de cães que apresentaram fluorescência na triagem da RIFI, o que pode indicar a presença da forma crônica da doença de Chagas, uma vez que o teste detecta anticorpos IgG, de resposta tardia, além de não ter ocorrido a detecção no teste molecular a partir do sangue dessas amostras. As três amostras pertenciam a fêmeas adultas, das quais duas cadelas foram diagnosticadas previamente com *Leptospira* spp., se tratando, portanto, de casos de coinfecção e a outra estava com sintomas como apatia e onicogrifose, sendo considerada suspeita de leishmaniose pelo veterinário da instituição.

Em relação aos testes moleculares da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, as 51 amostras positivas para *T. cruzi* recebem destaque, além das outras 100 que apresentaram já terem tido algum contato com o parasito. Pertencentes a todas as Unidades de Vigilância em Zoonoses estudadas, evidencia a presença de múltiplas infecções agudas da doença de Chagas em todos os municípios amostrados no litoral do estado de São Paulo, tanto em cães como em gatos, que apresentaram frequência maior de amostras positivas em relação ao total amostrado, sendo 26 positivas de 43 amostras de gatos (60,46%), em comparação a 25 positivas de 108 amostras de cães (23,15%).

Esses resultados corroboram com a hipótese da presença de vetores e a manutenção do ciclo de vida do parasito na região. O cão é um dos reservatórios mais importantes de *T. cruzi* e a detecção do parasito nesses animais possibilita com que sejam identificadas áreas de risco de transmissão da doença pelos programas de controle, mesmo antes de serem detectados casos humanos. Esses animais são classificados por sentinelas, uma vez que estão frequentemente presentes no ambiente doméstico e peridoméstico, onde os vetores também se encontram, tornando-os bons indicadores da circulação do parasita (Gürtler *et al*., 2007). Além disso, a análise das taxas de infecção dos animais sentinelas permitem que seja identificado o potencial de transmissão do parasita para os seres humanos (Freitas *et al*., 2018)

Vários estudos apresentam uma alta frequência de cães infectados com *Trypanosoma cruzi*, de forma que a prevalência de infecção nesses animais é maior

do que nos humanos (Crisante *et al*., 2006; Tenney *et al*., 2014). A presença de cães infectados no ambiente doméstico está associada a maior risco de infecção humana (Travi, 2019). No estudo desenvolvido por Gürtler e Cardinal (2015), mais de 1000 triatomíneos domésticos foram avaliados, mostrando que cães tiveram o maior índice de infecção pelo repasto sanguíneo (49%), em comparação aos gatos (39%) e humanos (38%).

Estudo conduzido por Castillo Neyra e colaboradores (2015), realizado no Peru, avaliou o uso de cães como sentinelas para identificar a transmissão de *T. cruzi* em uma área endêmica, com soroprevalência de 12,3% em cães, além da presença de triatomíneos em 41,1% dos domicílios, onde 17,4% estavam infectados com *T. cruzi*, constatando associação entre cães positivos e triatomíneos infectados em um raio de 50 metros, de forma que a detecção precoce de áreas de transmissão ativa pode direcionar intervenções preventivas e reforçar o controle vetorial.

Em relação a presença do parasito em gatos, a relevância dos felinos na transmissão da doença de Chagas ainda é pouco estudada. Neste estudo, foi observada a detecção de *T.cruzi* na qPCR em 14 gatos no município de Itanhaém, seis gatos em Ubatuba, quatro gatos em Peruíbe, um gato de São Sebastião e um gato de Mongaguá.

Os gatos podem ser infectados naturalmente por *T. cruzi*. Entretanto, não são considerados reservatórios tão eficientes como os cães. Ainda assim, podem contribuir para a manutenção do ciclo epidemiológico e servem como reservatório para o protozoário, contribuindo para a infecção de outros animais e dos humanos (Gürtler *et al*., 2007). Quando infectados, geralmente são assintomáticos, de forma que os felinos domésticos podem atuar como reservatórios, principalmente em áreas endêmicas, por longos períodos antes de serem diagnosticados (Freitas *et al*., 2022).

Eloy e Lucheis (2012) avaliaram, com base na hemocultura e PCR, a presença de *T. cruzi* em cães e gatos no estado de São Paulo, identificando o patógeno em 20%, em ambas as espécies. A PCR mostrou alta precisão na detecção do parasito, superando a hemocultura, principalmente em casos de baixa parasitemia, confirmando que os cães e gatos infectados podem atuar como reservatórios domésticos do parasita, reforçando necessidade da vigilância epidemiológica continuada.

Endêmica em várias regiões do Brasil, incluindo o estado de São Paulo, a doença de Chagas está presente em quase 40% do território brasileiro (Moncayo;

Silveira, 2009). Estudo de triatomíneos realizado por Silva e colaboradores (2007) em assentamentos rurais no estado de São Paulo revelou positividade de 62,5%, indicando o risco de infecção para a população. O Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo registrou 158 casos humanos da forma crônica da doença no estado nos últimos quatro anos, dos quais 36 casos pertencentes ao litoral do estado, nos municípios de Ilhabela, Ilha Comprida, Praia Grande e Santos (CVE, 2024).

Apesar da notificação de casos de doença de Chagas no litoral do estado de São Paulo, a região não apresenta muitos estudos, com as últimas pesquisas em humanos realizadas nos anos 80 e 90, no litoral Sul, durante o Programa de Controle da Doença de Chagas no Estado de São Paulo (Carvalho *et al*., 2003). Entretanto, os resultados moleculares de infecções agudas sugerem a circulação de vetores e a presença do parasito no litoral, possibilitando o surgimento de novos casos em animais e em humanos, enfatizando a importância da busca entomológica ativa e diagnóstico nos animais da região.

A identificação de *T. cruzi* em cães e gatos pode fornecer dados epidemiológicos sobre a transmissão desta zoonose no ambiente domiciliar e peridomiciliar. Além do diagnóstico, a busca de colônias de triatomíneos também é uma ferramenta essencial para identificar as espécies de vetores predominantes em determinada região. O estudo de Freitas e colaboradores (2018), realizado no Rio Grande do Norte, avaliou a presença de tripanosomatídeos e a soroprevalência de *T. cruzi* em cães, obtendo a captura de 68 triatomíneos, a maioria da espécie *Triatoma brasiliensis*, dos quais 41,2% estavam infectados com *T. cruzi*, além do diagnóstico de 218 cães, com 11% positivos para *T. cruzi*.

Os animais domésticos representam um elo entre o ciclo silvestre e doméstico de *T. cruzi*, envolvidos no ciclo epidemiológico desta zoonose. A identificação das espécies dos vetores possibilita compreender o comportamento da doença e o risco de transmissão para os humanos e animais domésticos (Freitas *et al*., 2018). O estudo de Pereira *et al*. (2021), desenvolvido na Amazônia, apresentou a detecção de um cão positivo após um ano de um teste negativo, realizado quando outro cão da mesma residência morreu de doença de Chagas aguda, evidenciando que o ciclo de transmissão no local está ativo, com risco de transmissão da zoonose para outros animais e humanos.

Cantillo-Barraza e colaboradores (2022) registraram crianças, cães e animais sinantrópicos positivos para *T. cruzi* em Vichada, na Colômbia, assim como a

presença de triatomíneos infectados, evidenciando a relação entre a transmissão silvestre de *T. cruzi* com a transmissão domiciliar de humanos e animais domésticos. Considerados os principais reservatórios peridomésticos de *T. cruzi*, os cães apresentam alta parasitemia na fase aguda da doença, atuando como reservatórios eficientes na manutenção do ciclo de vida do parasito, de forma que o diagnóstico e controle da transmissão da doença nestes animais são essenciais (Durães-Oliveira *et al*., 2024).

O estudo de Gürtler e colaboradores (2007) monitoraram através de sorologia e xenodiagnóstico cães e gatos no noroeste da Argentina, observando a infecção de 60% dos cães e 42% dos gatos. Os cães apresentaram três vezes mais capacidade infecciosa para os triatomíneos quando comparados aos gatos. Outro estudo realizado na Argentina com métodos sorológicos, moleculares e xenodiagnóstico observou que, tanto para cães quanto gatos, a PCR mostrou-se mais sensível que o xenodiagnóstico, com a diferença mais discrepante no último grupo, reforçando a alta capacidade infecciosa dos cães. Além disso, a sensibilidade da técnica molecular associada ao diagnóstico sorológico possibilita maior detecção de cães e gatos infectados, destacando a relevância do diagnóstico para o controle da transmissão em áreas endêmicas (Enriquez *et al*., 2013).

Também foi constatada a presença de gatos infectados por *T. cruzi* no sul do Texas, em que sinais cardíacos foram manifestados em 42,1% dos animais, além de demonstrar a presença do parasito em outros tecidos como esôfago, nervo ciático e músculos, o que mostra que os gatos domésticos atuam também como reservatórios da doença e evidencia a necessidade de mais estudos sobre o impacto clínico da infecção em gatos e seu impacto na ecologia da doença de Chagas (Zecca *et* al., 2020). A fim de melhorar a vigilância epidemiológica e auxiliar no controle da doença de Chagas, o diagnóstico dos animais se faz necessário, sobretudo em áreas endêmicas, com a utilização de testes sensíveis e de baixo custo, fornecendo dados epidemiológicos importantes sobre os reservatórios de *T. cruzi* nessas regiões (Freitas *et al*., 2022).

No estado de São Paulo, após o controle da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, espécies secundárias passaram a ser foco do controle da doença. O triatomíneo *Panstrongylus megistus* apresenta o comportamento de colonização dentro dos domicílios e no peridomicílio, adaptação resultante da ação humana na redução de suas fontes alimentares no ambiente silvestre. Com distribuição sazonal

pelo estado, acompanhando os períodos chuvosos, está associada aos animais sinantrópicos, como gambás e roedores. A pesquisa por triatomíneos na região metropolitana de São Paulo resultou na identificação de 137 exemplares entre os anos de 2015 e 2019, em 8 municípios, onde 34 estavam infectados por *T. cruzi* (Silva; Estevão; Duarte, 2019).

A ação humana no desmatamento, principalmente para a construção de residências em condomínios, aproxima os animais silvestres do homem, incluindo os vetores triatomíneos, além do uso de palmeiras nos projetos de paisagismo, aproximando vetores, possivelmente infectados por mamíferos silvestres, de animais domésticos e dos humanos (Leite, 2019). Um dos pilares da vigilância epidemiológica da doença de Chagas é a vigilância entomológica, uma vez que a identificação de vetores infectados antes do estabelecimento de reservatórios e infecção dos humanos previne a formação de colônias no domicílio e peridomicílio, fator essencial para a manutenção do ciclo da doença (Brasil, 2005).

Levando isso em consideração, e diante dos resultados obtidos no presente estudo, é sugerida a realização da busca ativa por vetores triatomíneos nos seis municípios testados, assim como o diagnóstico destes insetos para a presença de *T. cruzi*, fornecendo mais informações sobre a transmissão do parasito na região, pois os estudos de vetores do *T. cruzi* na região litorânea de São Paulo são desconhecidos. Visto que, além da detecção de infecções crônicas com o teste sorológico, baseados na detecção de anticorpos IgG, os testes moleculares apontaram a presença de muitos casos agudos, característicos de infecções recentes, evidenciando a ocorrência da transmissão vetorial e provável presença de triatomíneos infectados nos municípios.

O grande número de reservatórios de *T. cruzi* no ambiente silvestre em toda a América significa que a infecção não pode ser erradicada. Contudo, os órgãos de saúde pública buscam a eliminação da transmissão para os humanos, além do diagnóstico precoce dos infectados, o tratamento e acompanhamento adequados. Algumas das recomendações da Organização Mundial da Saúde para prevenção e controle da doença em relação a transmissão vetorial são: desenvolvimento de materiais educativos, contextualizados para a área geográfica, baseados na abordagem de Uma Só Saúde; uso de inseticidas residuais para pulverizar os domicílios e peridomicílio; melhorias na infraestrutura das casas e limpeza adequada, para prevenir infestações; medidas pessoais preventivas, como o uso de mosquiteiros

e boas práticas sanitárias na preparação, armazenamento e consumo de alimentos (WHO, 2024).

Com a perspectiva da Uma Só Saúde e compreendendo a doença de Chagas como uma doença tropical negligenciada, esta foi incluída no Programa Brasil Saudável, desenvolvido pelo Ministério da Saúde. Instituído pelo decreto nº 11.908, de 6 de fevereiro de 2024, este programa prevê a eliminação das doenças e infecções determinadas socialmente até 2030, com a redução da carga de transmissão e morbidade (Brasil, 2024e). Encarada como problema de saúde pública, as ações de combate integram setores relacionados a saúde, moradia, renda, acesso à saneamento básico e educação (Brasil, 2025).

Durante a fase aguda da doença de Chagas, muitas pessoas desconhecem que foram infectadas, por serem assintomáticas ou apresentarem sinais clínicos inespecíficos, não procurando tratamento. Estes dados são justificados pela OPAS (Organização Panamericana de Saúde), a qual informa que 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas (OPAS, 2021). Considerando a importância do diagnóstico precoce, a dificuldade para o início do tratamento na fase aguda facilita a progressão da doença para a fase crônica, resultando em doença prolongada que pode levar a óbito (Kruse *et al*., 2019).

Até a inserção da doença de Chagas de fase crônica como doença de notificação compulsória nacionalmente (Portaria nº 1.061 de 18 de maio de 2020), somente a fase aguda estava incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e Imediata (Brasil, 2020). No entanto, há muitos casos de subnotificação da doença no país, não sendo possível estimar a prevalência da doença com precisão. Ademais, outro problema é a reativação da doença, uma vez que mesmo assintomático, um paciente crônico possui o parasito em seu organismo com uma parasitemia baixa e, ao apresentar imunodeficiência, como no caso da Aids, uso de imunossupressores ou quimioterapia, o parasito se multiplica novamente, levando a quadro grave e até a morte (Leite, 2019).

Dentre os resultados desta pesquisa, houve também um cão no município de Peruíbe, macho adulto, cuja amostra de sangue foi amplificada para *Leishmania* (*L.*) *infantum* na PCR convencional com o uso dos *primers* LCH14/LCH15, o que pode indicar agudização da infecção, de forma que este animal possa atuar como reservatório do protozoário e, também, fonte de infecção para os flebotomíneos. Entretanto, o animal foi não reagente à prova de RIFI, tanto para *L. infantum* quanto

para *T. cruzi,* reiterando a possibilidade de que, no momento da coleta, o animal estava em infecção aguda, tendo em vista a detecção molecular no sangue e a ausência de anticorpos específicos para o agente. Temos como limitação neste caso, a impossibilidade de realização de nova coleta, para verificação do título de anticorpos, com a evolução para a fase crônica. Tampouco, não foi possível o acompanhamento deste animal para a realização de coletas de outras amostras biológicas (por exemplo, punção de linfonodo, punção de medula óssea) para melhor elucidação do diagnóstico.

Na PCR quantitativa 19 amostras apresentaram possibilidade de contato com o parasito, pertencentes as seis Unidades de Vigilância em Zoonoses estudadas, mas apresentaram o Ct maior que o ponto de corte estabelecido, de forma que não possuíram carga parasitária suficiente para serem consideradas positivas. Esses resultados evidenciam a presença do parasito causador da leishmaniose visceral e dos vetores na região litorânea, possibilitando a ocorrência de infecções, tanto em animais quanto humanos.

De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo (2022), na classificação epidemiológica dos municípios estudados nessa pesquisa, segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Peruíbe é classificado como município silencioso não receptivo e não vulnerável, enquanto os municípios de Itanhaém, Mongaguá e São Sebastião se enquadram na classificação de município silencioso não receptivo vulnerável. O município de Ubatuba apresenta transmissão canina por vetor secundário e o município do Guarujá apresenta transmissão canina e humana.

Assim como a doença de Chagas, a leishmaniose também é uma doença subnotificada, dificultando a implementação de políticas públicas eficazes de controle. Dentre as causas da subnotificação merece destaque o diagnóstico negligenciado por falta de recursos ou conhecimento do profissional de saúde, o diagnóstico incorreto devido a presença de sinais clínicos inespecíficos e sistemas de vigilância epidemiológica e controle que não abrangem toda a área endêmica da doença. A subnotificação dificulta a avaliação da prevalência e a implementação de medidas preventivas, além de impedir o tratamento adequado, podendo agravar o quadro dos pacientes levando-os a óbito (Carvalho *et al*., 2023).

Tendo em vista a amostra amplificada para *Leishmania* (*L.*) *infantum*, o cão possivelmente apresenta infecção aguda, que pode ter sido adquirida no município de

Peruíbe, indicando a presença de vetores infectados no local. Contudo, como os animais das Unidades de Vigilância de Zoonoses são provenientes das ruas, este animal infectado pode ter origem de outro município próximo, onde há a transmissão canina da leishmaniose visceral registrada. Além disso, tratando-se de amostras de animais errantes resgatados, estes podem ter tido contato com várias zoonoses em áreas urbanas, rurais e até mesmo adentrado áreas de mata, possibilitando o contato com vetores e outros reservatórios das zoonoses estudadas.

Também é de grande importância analisar o local em que este animal está inserido, pois existe a possibilidade de que os vetores flebotomíneos estejam presentes na região. A Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe, apesar de estar em área urbana, apresenta muitos terrenos arborizados ao seu redor (Figura 28), que podem ser habitat para os vetores (Oliveira *et al*., 2016). A higienização adequada e frequente do local também é de extrema importância, uma vez que o acúmulo de matéria orgânica pode atrair e manter criadouros de flebotomíneos ao local (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022).

A colocação de armadilhas para flebotomíneos e telas protetoras para insetos, como telas antiafídeo, deveriam ser implementadas na UVZ de Peruíbe, pois a presença de um cão infectado revela essa necessidade, uma vez que este pode servir de fonte de repasto sanguíneo para vetores que podem acabar infectando outros animais da instituição, os funcionários do local, e até mesmo os residentes que moram ao redor da instituição, já que diversas baias são abertas e próximas a áreas de mata, permitindo a livre circulação desses insetos. O isolamento do animal ou o uso de coleira repelente, impregnada com deltametrina, também é uma ação que pode ser implementada para impedir o ciclo de vida do parasito no local (Coura-Vital *et al*., 2018).

A Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do estado de São Paulo tinha como função o controle de endemias com a busca ativa de vetores, uso de inseticidas e implementação de medidas preventivas, como as descritas anteriormente, além do monitoramento do número de casos, exercendo função essencial no controle de várias zoonoses nos municípios (Camargo-Neves *et al*., 2006). Entretanto, extinta em 2020 pelo governo, atualmente os municípios encontram-se sem um órgão específico para o controle destas doenças, prejudicando a vigilância epidemiológica ativa e direcionada para o controle de vetores em todo o estado.



Figura 28. Localização da Unidade de Vigilância em Zoonoses do município de Peruíbe-SP, destacada em vermelho, rodeada por fragmentos de mata e residências. Fonte: Adaptado de Google Earth, 2024.

Por muitos anos, o controle dessas zoonoses consistiu na eutanásia dos animais infectados, sendo uma alternativa com pouco custo, porém não é socialmente aceita, além do fato de que outros animais que irão ocupar o mesmo ambiente continuarão suscetíveis a infecção devido a presença de vetores no ambiente (Melo *et al*., 2018). Atualmente, o uso de coleiras impregnadas com deltametrina é uma alternativa promissora para o controle, disponíveis comercialmente e de fácil implementação, pois sua ação repelente faz com que o animal infectado não seja mais fonte de repasto sanguíneo de vetores; entretanto, é um produto com custo elevado, além da necessidade de sua reposição até seis meses de uso, ou devido a perda das coleiras, necessitando de substituição (Travi, 2019).

Por fim, o uso de inseticidas por via oral é uma alternativa para o controle de vetores, de fácil implementação e apresenta boa duração, mas também apresenta custo elevado, além de não proteger o animal da infecção, uma vez que o vetor precisa fazer o repasto sanguíneo para ingerir o inseticida e ser eliminado (Travi, 2019). O

conceito de Uma Só Saúde também contribui para o controle das zoonoses, como no caso das ações de Educação Ambiental com a população, podendo envolver agentes de saúde e outros profissionais, para a conscientização dos fatores de risco para a infecção e as medidas de higiene e antiparasitárias que podem afastar os vetores do ambiente urbano. Os funcionários das instituições relacionadas ao controle de zoonoses também devem receber treinamento adequado, de forma que possam compreender a importância da manutenção das medidas sanitárias, além dos órgãos municipais responsáveis priorizarem a manutenção das Unidades de Vigilância em Zoonoses e contratação de mais veterinários e tratadores, contribuindo para a saúde dos animais abrigados nessas instituições.

O levantamento de vetores da leishmaniose visceral na região litorânea do estado é escasso, uma vez que a maioria dos casos em humanos se concentram na região noroeste do estado. Entretanto, em 2022 foi confirmada a transmissão canina no Guarujá e em Ubatuba e a presença de casos humanos autóctones de leishmaniose visceral somente no município do Guarujá, indicando a presença de vetores nestes municípios (CVE, 2022).

Em relação aos casos humanos de leishmaniose visceral, o município do Guarujá é a única cidade do litoral do estado com casos notificados recentes. Destes, dois casos foram notificados em 2016, e ambos vieram a óbito, e um caso em 2017, que foi tratado. O papel dos cães na leishmaniose visceral é crucial, pois a prevalência é maior que a de humanos, além de que podem permanecer como fontes de infecção por longos períodos sem manifestarem sinais clínicos e virarem suspeitos, tornando-os importantes na manutenção do ciclo de vida do parasito, especialmente em áreas urbanas. (Oliveira *et al*., 2019b).

Apesar da ausência de amostras positivas para *L. infantum* no município do Guarujá, a Unidade de Vigilância em Zoonoses deste município enfrenta um problema de superlotação de cães, em que a quantidade de funcionários e a infraestrutura do local não comportam o grande número de animais. A necessidade de mais tratadores e veterinários foi apontada na devolutiva para a UVZ, juntamente com as medidas de prevenção, como a instalação de tela mosquiteiras e o uso de coleiras repelentes, uma vez que o acúmulo de excretas no local pode atrair flebotomíneos, que podem estar infectados e transmitir a zoonose para os animais. A instituição também realiza atendimento veterinário gratuito para a população, de forma que há uma grande circulação de pessoas e seus animais domésticos.

Vários fatores como a presença e distribuição de vetores, taxa de infecção natural e sazonalidade são importantes para o desenvolvimento das medidas de controle da leishmaniose visceral em áreas endêmicas (Mota *et al*., 2019). Endêmica no estado de São Paulo, a leishmaniose visceral era predominante nas áreas rurais, atingindo apenas pequenos centros urbanos, porém esta passou por um processo de urbanização, estando presente atualmente em grandes municípios, de forma que 70% dos casos atuais ocorrem em regiões urbanas (Reis *et al*., 2017).

Silva e colaboradores (2011) analisaram a distribuição espacial da leishmaniose visceral em área litorânea do Rio de Janeiro, onde 63% dos cães estudados estavam infectados, indicando a transmissão ativa do parasita, além de encontrarem dois *hotspots* com alta transmissão da doença, localizados perto de áreas de Mata Atlântica, sugerindo a influência dos fatores ambientais na disseminação da doença.

Os municípios do litoral do estado de São Paulo também estão inseridos em região de Mata Atlântica, ambiente favorável para a existência de reservatórios e vetores da zoonose, necessitando-se de mais estudos para a leishmaniose visceral na região. Outro fator relevante é a relação positiva entre a presença de cães infectados e o surgimento de novos casos humanos, o que reforça a necessidade de monitorar e controlar a infecção em cães para prevenir a disseminação da doença em humanos (Silva *et al*, 2011).

Vilas Boas e colaboradores (2024) realizaram uma revisão sobre a leishmaniose visceral canina a epidemiologia da doença, analisando os fatores associados a manutenção e aumento da transmissão, constatando que a casos emergentes em áreas que anteriormente eram consideradas não endêmicas, como o Uruguai, destacam uma expansão geográfica. Os cães infectados por *Leishmania infantum* apresentam alta carga parasitária na pele, facilitando a infecção de flebotomíneos e podem manter o ciclo de transmissão, mesmo quando assintomáticos, apresentando prevalência de até 75% em alguns locais no Brasil. Além disso, a infecção em cães geralmente precede a infecção em humanos, sendo um indicador para a vigilância.

Braga, Langoni e Lucheis (2014) relataram a presença de *Leishmania* spp. em cães e gatos de áreas endêmicas e não endêmicas do Brasil, utilizando a hemocultura, PCR e RIFI, constatando que a leishmaniose felina pode apresentar subnotificação devido à menor resposta imunológica em gatos, de forma que a associação de

diferentes técnicas diagnósticas aumenta a precisão na identificação de animais infectados, contribuindo para estratégias mais eficazes de controle.

O estudo de Hartmann e colaboradores (2023) constatou a soropositividade para *Leishmania infantum* em gatos necropsiados em uma área de transmissão de leishmaniose visceral no sul do Brasil, constatando que, mesmo sem casos clínicos aparentes, os gatos podem ser hospedeiros do parasito em áreas endêmicas. Outro estudo em Pernambuco registrou um caso de leishmaniose visceral felina em uma área endêmica, sugerindo que os gatos podem ser hospedeiros potenciais da *L. infantum* e apresentam papel emergente na epidemiologia da zoonose, devendo ser considerados pelos profissionais da saúde como possíveis reservatórios em áreas urbanas e rurais (Berenguer *et al*., 2020).

A ausência de sinais clínicos em gatos infectados por *Leishmania* spp. é comum, como constatado em estudo realizado no estado de São Paulo, e 13,5% dos gatos amostrados estavam infectados sem a presença de sinais clínicos (Oliveira *et al*., 2015). Coelho e colaboradores (2011) investigaram a presença de *Leishmania* spp. em gatos, também no estado de São Paulo, utilizando técnicas parasitológicas e moleculares, e 5,76% dos gatos amostrados foram positivos, reforçando a necessidade de incluir os gatos como potenciais reservatórios nas ações de vigilância da leishmaniose.

O xenodiagnóstico é uma técnica para avaliar a infecciosidade de determinado animal. Os gatos são capazes de transmitir o parasito, mesmo assintomáticos, atuando como hospedeiros secundários de *L. infantum*, e podem contribuir para a transmissão em áreas endêmicas, com alta presença de flebotomíneos. No entanto, são necessários mais estudos epidemiológicos para compreender melhor o papel dos felinos na transmissão da leishmaniose visceral (Vioti *et* al., 2021).

Em áreas urbanas endêmicas para a leishmaniose visceral os animais estão submetidos a fatores de risco que devem ser considerados por seus tutores na prevenção da zoonose. O estudo de Barbosa e colaboradores (2022) sugere que as políticas de controle também devem abranger estratégias educacionais em relação a conscientização das práticas de manejo de cães, uma vez que a investigação dos autores de infecções em cães provenientes de quatro regiões urbanas e endêmicas do Brasil registrou taxa de positividade de 9,8%, e fatores como o acesso dos animais à rua fez com que estes tivessem 1,5 vezes mais propensos à infecção.

A leishmaniose não está inclusa no Programa Brasil Saudável, apesar de incluir doenças infecciosas que atingem a população em situação de vulnerabilidade social. A doença é tratada em outros programas de saúde, como no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV), com ações que buscam diminuir a mortalidade e morbidade, o controle de reservatórios e vetores e ações de Educação Ambiental. Entretanto, no estudo realizado por Zuben e Donalísio (2016), foi constatado que as ações realizadas pelo Programa não são completamente eficientes devido à descontinuidade das atividades de controle, resistência dos proprietários de cães com indicação de eutanásia e baixa cobertura do controle químico, ressaltando a necessidade de reavaliar a política de controle da doença.

Assim como o programa citado, a Semana Nacional de Controle e Combate à Leishmaniose também apresenta ações educativas e preventivas para a leishmaniose visceral e tegumentar, com a implementação medidas de controle como manejo ambiental, controle de vetores e o tratamento de humanos e animais infectados, além de debates sobre as políticas públicas de vigilância e controle da zoonose (Brasil, 2022b).

Lago e colaboradores (2023) registraram a presença de cães infectados por *Leishmania braziliensis* na Bahia, região endêmica para a leishmaniose visceral e tegumentar, reforçando que cães são reservatórios relacionados a transmissão da leishmaniose tegumentar para humanos, uma vez que a chance de contrair a doença foi quatro vezes maior nas residências com cães infectados. Levando em consideração a relevância dos cães no ciclo de transmissão, as políticas públicas de controle da leishmaniose devem considerar estratégias específicas para cães em áreas endêmicas, com o diagnóstico como ferramenta essencial para o controle da transmissão.

Apesar de não ter sido identificada nenhuma amostra positiva para *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, a leishmaniose tegumentar é uma doença endêmica no litoral, tendo a presença de casos na região desde a década 70. O estudo de Forattini e colaboradores (1973) registrou a presença de 17 casos autóctones de leishmaniose tegumentar na região do litoral paulista, sugerindo a transmissão intradomiciliar em uma região com vegetação florestal abundante.

Somente nos anos 90 que epidemias da leishmaniose tegumentar começaram a ocorrer no litoral norte do estado de São Paulo. No período de 1993 a 2005, foram registrados 689 casos autóctones, dos quais 81 do município de Caraguatatuba, 229

de Ilhabela, 164 de São Sebastião e 215 de Ubatuba. Dados entomológicos do mesmo período, fornecidos pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), registram a captura de 2758 flebotomíneos. Destes, 83% eram da espécie *Nyssomyia intermedia* e 51% capturados no peridomicílio, principalmente em regiões de mata, de forma que a transmissão foi relacionada com os focos enzoóticos (Condino *et al*., 2008). Desde então, os casos de leishmaniose tegumentar no litoral tornaram-se mais expressivos. De 2007 a 2023, o Centro de Vigilância Epidemiológica registrou 220 casos no litoral, com 60 no município de Santos e 160 no município de Caraguatatuba (CVE, 2023). A instituição também realizou um levantamento de vetores em 2022, em que foi encontrado o flebotomíneo *Nyssomyia intermedia* nos municípios de Ubatuba e Guarujá (CVE, 2022).

O número de casos de leishmaniose tegumentar no litoral acompanhou o crescente fluxo migratório para a região, somados ao desmatamento da Mata Atlântica para a ocupação humana, que aproximou os reservatórios e vetores da população, sendo a espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* o principal agente etiológico do litoral norte. A proximidade do domicílio da vegetação remanescente, principalmente da população em situação de vulnerabilidade social e a presença de animais domésticos, possibilita a manutenção da infecção na região (Condino *et al*., 2008).

A Mata Atlântica é um hábitat natural para os flebotomíneos, onde ocorre a manutenção do ciclo silvestre dos parasitos causadores das leishmanioses. O estudo de Silva e colaboradores (2017b) investigou a presença de flebotomíneos em uma região de Mata Atlântica da região nordeste, onde foram capturados 2.174 indivíduos, de 10 espécies diferentes, com incidência predominante em períodos chuvosos, evidenciando a necessidade da vigilância epidemiológica em áreas endêmicas para a leishmaniose tegumentar.

6.2 Limitações do Estudo

Como limitação para o diagnóstico das infecções por *Leishmania* (*L.*) *infantum, L.* (*Viannia*) *braziliensis* e *T. cruzi*, nos animais avaliados, foi possível apenas a realização de uma única coleta de sangue nas UVZs, tendo em vista que, para a prova sorológica de RIFI, seria oportuno a realização de uma sorologia pareada, 15 a 20 dias após a primeira coleta, para verificação do aumento ou não do título de anticorpos, bem como a verificação de reações cruzadas (Luciano *et al*., 2009). Ainda, a coleta de outros materiais biológicos, por exemplo, provenientes de linfonodos,

ampliaria a possibilidade de detecção de material genético de *Leishmania* e *Trypanosoma*, auxiliando na análise e discussão dos resultados.

Outra limitação que podemos considerar no presente estudo, foi a quantidade de sangue total disponibilizada, uma vez que a coleta foi dificultada em alguns casos pelo comportamento arredio dos animais, mas também pelo tamanho e condição de saúde do mesmo, principalmente em gatos, variando de 0,5 a 3mL de amostra para serem utilizados em todas as técnicas do estudo. Consequentemente, a repetição de algumas técnicas não foi possível, como a realização de uma nova extração de DNA para o uso em mais testes moleculares. Outrossim, após a devolutiva às Unidades de Vigilância em Zoonoses, muitos animais haviam sido adotados durante o tempo transcorrido da pesquisa, impossibilitando a realização de nova coleta para acompanhamento dos casos reagentes à sorologia e positivos à prova molecular. Neste caso, os veterinários responsáveis pelas instituições comunicaram os novos donos para a realização dos exames, porém não foi possível avaliar se estes foram realizados. Esse fato pode ser mais um fator de risco para a população, pois estes animais possivelmente infectados estão dentro do domicílio, em contato com outros animais e humanos, podendo servir como reservatórios do parasito.

6.3 Considerações Finais

Apesar de existirem casos humanos de doença de Chagas e leishmanioses no litoral de São Paulo e a região ser considerada endêmica para essas zoonoses, os estudos de levantamento de vetores e de reservatórios são desconhecidos. Dessa forma, o diagnóstico para *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, a partir de prova sorológica e testes moleculares, nos animais das Unidades de Vigilância em Zoonoses do litoral paulista podem auxiliar no diagnóstico de protozooses da região, além de elucidar as relações entre parasito, vetor e reservatório nestes municípios, necessitando-se, portanto, de constante vigilância epidemiológica.

Os resultados evidenciam a importância do monitoramento da doença em animais sentinelas, possibilitando que a presença do vetor no local e a transmissão do parasito seja detectada antes da infecção humana. Os animais infectados podem servir como reservatórios, contribuindo para a manutenção do ciclo de vida dos parasitos nessas instituições. Os cães e gatos encontrados nas Unidades de Vigilância de Zoonoses (UVZs) são em grande maioria provenientes das ruas, onde

estiveram expostos à diferentes vetores presentes nas áreas urbanas e rurais, incluindo os pertencentes ao gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*.

Ademais, o contato frequente desses animais com a população enfatiza a necessidade de se estudar estas zoonoses para a vigilância epidemiológica, a fim de que se possa estabelecer medidas preventivas para se diminuir o risco de transmissão dessas zoonoses para os funcionários dessas instituições, a população residente e também visitantes, uma vez que os municípios litorâneos apresentam elevado número de turistas, permitindo assim a implementação de métodos de controle de vetores no ambiente, para o controle das tripanossomíases nestes locais. Por fim, sendo o estudo dessas zoonoses em animais desconhecido no litoral do estado de São Paulo, os resultados dessa pesquisa podem fornecer dados epidemiológicos relevantes para o monitoramento dessas doenças na região.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a presença de cães e gatos infectados por *T. cruzi* em todos os municípios amostrados e uma infecção por *L. infantum* em cão de um município.

- A técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real foi eficiente na detecção dos parasitos nas amostras utilizadas nesse estudo, contrapondo-se ao *primer* para *T. cruzi* utilizado na PCR convencional, que não detectou nenhuma das 51 amostras positivas para o parasito na qPCR;

- A distribuição geográfica das amostras positivas para *T. cruzi* nos municípios participantes apontou o município de Itanhaém como o que apresentou o maior número de animais positivos, seguido pelos municípios de Mongaguá e Ubatuba;

- A proposição de medidas para diminuição do risco de transmissão das zoonoses avaliadas foi realizada, com a devolutiva para os médicos veterinários das UVZs, responsáveis pelos animais nos quais foram detectadas a positividade para *Leishmania* (*L.*) *infantum* e/ou *Trypanosoma cruzi,* para dar sequência a conduta veterinária adequada.

- Propõe-se a ampliação da área de estudo e a busca ativa de vetores nos municípios do litoral do estado de São Paulo a fim de estimar a prevalência dessas zoonoses na região, além da implementação de medidas preventivas de vigilância como a utilização de telas protetoras, coleiras repelentes, armadilhas para vetores e ações de Educação Ambiental.

Referências

REFERÊNCIAS[1]

AKHTARDANESH, B.; MOSTAFAVI, M.; KHEDRI, J.; FAKHRI, A.; SHARIFI, I.; SHAHRAKI, M. M. Seroepidemiology of visceral leishmaniasis among free-roaming dogs and children in Zahedan city, southeast of Iran, 2018-2020. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, 2021.

ALVES-MARTIN, M. F.; BERTOZZO, T. V.; AIRES, I. N.; MANZINI, S.; PAIXÃO-MARQUES, M. S.; GUIRALDI, L. M.; SANTOS, W. J.; SÁNCHEZ, G. P.; CURCI, V. C. L. M.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B. Detection of *Leishmania* spp. in Cats: Analysis of Nasal, Oral and Conjunctival Swabs by PCR and HRM. **Animals**, v. 13, n. 15, p. 2468, 2023.

BANU, S. S.; MEYER, W.; FERREIRA-PAIM, K.; WANG, Q.; KUHLS, K.; CUPOLILLO, E.; SCHÖNIAN, G.; LEE, R. A novel multilocus sequence typing scheme identifying genetic diversity amongst *Leishmania donovani* isolates from a genetically homogeneous population in the Indian subcontinent. **International Journal for Parasitology**, v. 49, p. 555-567, 2019.

BARBOSA, D. S.; BELO, V. S.; BEZERRA, J. M. T.; FIGUEIREDO, F. B.; WERNECK, G. L. Factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs from urban áreas endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 152, p. 651-656, 2022.

BARRETO, M.P. Tripanossomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Revista Brasileira do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.7, p. 305-315, 1967.

BERENGUER, L. K. A. R.; GOMES, C. F. C. A.; NASCIMENTO, J. O.; BERNARDI, J. C. M.; LIMA, V. F. S.; OLIVEIRA, J. B.; RAMOS, C. A. N.; RAMS, R. A. N.; ALVES, L. C. *Leishmania infantum* Infection in a Domestic Cat: A Real Threat or na Occasional Finding? **Acta Parasitologica**, v. 66, p. 673-676, 2021.

BEZERRA, C. M.; BARBOSA, S. E.; SOUZA, R. C. M.; BAREZANI, C. P.; GÜRTLER, P. E.; RAMOS, A. N.; DIOTAIUTI, L. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 642-656, 2018.

BEZERRA, G. S. N.; BARBOSA-JÚNIOR, W. L.; SILVA, E. D.; LEAL, N. C.; MEDEIROS, Z. M. Urine as a promising sample for *Leishmania* DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis – a review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 111-120, 2019.

[1]ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 22p.

BRAGA, A. R. C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B. Evaluation of canine and Feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 5, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Consenso brasileiro em doença de Chagas**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, supl. III, 2005. Acessado em: 21 out. 2024. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/chagas05_consenso_svs.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota técnica nº1/2011 – CGLAB/CGDT/DEVIT/SVS/MS:** recomendações para vigilância, diagnóstico, manejo clínico e controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. Acessado em: 14 jan 2025. Disponível em: https://crmvms.org.br/wp-content/uploads/2019/10/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc_98999048.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** 5ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar.** 2ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 50, n. 2, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS nº 1.061, de 29 de maio de 2020**. Acessado em: 7 nov. 2024. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt1061_29_05_2020.html.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da doença de Chagas**. 2022a. Acessado em: 15 out. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica

BRASIL. Ministério da Saúde. **Semana Nacional de Controle e Combate à Leishmaniose: 8 a 15 de agosto de 2022**. 2022b. Acessado em: 6 jan. 2025. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/08-a-15-8-semana-nacional-de-controle-e-combate-a-leishmaniose/.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral**. 2024a. Acessado em: 12 out. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar**. 2024b. Acessado em: 12 out. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas**. 2024c. Acessado em: 15 out. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas

BRASIL. Ministério da Saúde. **Uma Só Saúde**. 2024d. Acessado em: 16 out. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/u/uma-so-saude

BRASIL. **Decreto nº 11.908, de 12 de dezembro de 2024.** Regulamenta dispositivos da Lei nº 13.979, de 6 de fevereiro de 2020. 2024e. Acessado em: 6 jan. 2025. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/decreto/d11908.htm.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Brasil Saudável.** Acessado em: 6 jan. 2025. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/brasil-saudavel.

CAN, H.; DÖSKAYA, M.; ÖZDEMIR, H. G.; SAHAR, E. A.; KARAKAVUK, M.; PEKTAS, B.; KARAKUS, M.; TÖZ, S.; CANER, A.; DÖSKAYA, A. D.; IZ, S. G.; ÖZBEL, Y.; GÜRÜZ, Y. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of Izmir, Turkey. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 109-114, 2016.

CANTILLO-BARRAZA, O.; SOLIS, C.; ZAMORA, A.; HERAZO, R.; OSORIO, M. I.; GARCÉS, E.; XAVIER, S.; MEJÍA-JARAMILLO, A. M.; TRIANA-CHÁVEZ, O. Enzootic *Trypanosoma cruzi* infection by *Rhodnius prolixus* shows transmission to humans and dogs in Vichada, Colombia. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 8, p. 227-234, 1966.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; PAULIQUÉVIS-JÚNIOR, C.; SAMPAIO, S. M. P.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; SCANDAR, S. A.; MAYO, R. C. **A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo e a estruturação do Programa de Vigilância e Controle Estadual**. In: SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – SUCEN. Recortes históricos 2 - Sucen 30 anos - 2006. São Paulo: SUCEN, 2006. p. 40-44

CARDOSO, R. M.; ARAÚJO, N. N. S. L.; ROMERO, G. A. S.; SOUZA, T. T. C. M.; DIETRICH, A. G.; MENDES, J. D.; REIS, M. L.; FERREIRA, J. B. C.; HECHT, M. M.; GURGEL-GONÇALVES, R. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 171, 2015.

CARNEIRO, L. A.; SANTOS, T. V.; LIMA, L. V. R.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B.; SILVEIRA, F. T. First report on feline leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Amazonian Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 19, 2020.

CARVALHO, M. E.; SILVA, R. A.; BARATA, J. M. S.; DOMINGOS, M. F.; CIARAVOLO, R. M. C.; ZACHARIAS, F. Chagas' disease in the Southern coastal region of Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 49-58, 2003.

CARVALHO, A. G.; LUZ, J. G. G.; RODRIGUES, L. D.; DIAS, J. V. L.; FONTES, C. J. F. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 125, 2019.

CARVALHO, R. C.; PEREIRA, C. R.; BARÇANTE, T. A.; CASTRO, J. C.; ALVARENGA, I. M. Leishmaniasis: neglected diseases also by health professionals. **Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 21, n. 12, p. 24165-24189, 2023.

CASTILLO-CASTAÑEDA, A. C.; PATIÑO, L. H.; ZUÑIGA, M. F.; CANTILLO-BARRAZA, O.; AYALA, M. S.; BAUTISTA, J.; URBANO, P.; JAIMES-DUEÑEZ, J.; RAMÍREZ, J. D. An overview of the trypanosomatid (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parasites infecting several mammal species in Colombia. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 471, 2022.

CASTILLO-NEYRA, R.; CHU, L. C.; QUISPE-MACHCA, V.; ANCCA-JUAREZ, J.; CHAVEZ, F. S. M.; MAZUELOS, M. B.; NAQUIRA, C.; BERN, C.; GILMAN, R. H.; LEVY, M. Z. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 120, n. 3, p. 349-356, 2015.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 305, 2022.

COELHO, W. M. D.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K. D. S. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2, p. 281-282, 2011.

CONDINO, M. L. F.; GALATI, E. A. B.; HOLCMAN, M. M.; SALUM, M. R. B.; SILVA, D. C.; JÚNIOR, R. A. N. Leishmaniose tegumentar americana no Litoral Norte Paulista, período 1993 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 635-641, 2008.

COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and erradicarion. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962-967, 2013.

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

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; LEAL, G. G. A.; MOREIRA, N. D.; OLIVEIRA, L. A. M.; MACHADO, E. M. M.; MORAIS, M. H. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PloS One**, v. 9, n. 3, 2014.

COURA-VITAL, W.; LEAL, G. G. A.; MARQUES, L. A.; PINHEIRO, A. C.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: a large scale intervention study in na endemic área in Brazil. **PLOS One**, v. 12, 2018.

CRISANTE, G.; ROJAS, A.; TEIXEIRA, M. M. G.; AÑEZ, N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. **Acta Tropica**, v. 98, p. 247-254, 2006.

CRUZ, A. C. F. G.; SANTOS, N. A. F.; JERALDO, V. L. S.; MADI, R. R.; ROSA, J. A.; MELO, C. M. Shelter dogs as indicators for *Trypanosoma cruzi* infection in na urban area of Aracaju, Brazil. **Acta Tropica**, v. 210, 2020.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac**”. Dados Estatísticos leishmaniose visceral.** 2022. Acessado em: 22 out. 2024. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agravos/leishmaniose-visceral/dados-estatisticos

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac**”. Dados Estatísticos leishmaniose tegumentar.** 2023. Acessado em: 22 out. 2024. Disponível em: https://saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/oldzoonoses/leishmaniose-tegumentar-americana/dados-estatisticos

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. **Dados Estatísticos doença de Chagas**. 2024. Acessado em: 21 out. 2024. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agravos/chagas/dados-estatisticos

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis.* **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DAVID, C. F.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491-502, 2009.

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, p. 45-58, 1992.

DURÃES-OLIVEIRA, J.; PALMA-MARQUES, J.; MORENO, C.; RODRIGUES, A.; MONTEIRO, M.; ALEXANDRE-PIRES, G.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Chagas Disease: A Silent Threat for Dogs and Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, p. 3840, 2024.

EDVINSSON, B. **Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients**. 2006. 66f. Tese (Clinical Bacteriology) – Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital Huddinge, Estocolmo. 2006.

EL TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

ELOY, L. J.; LUCHEIS, S. B. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, p. 6, 2012.

ENRIQUEZ, G. F.; CARDINAL, M. V.; OROZCO, M. M.; SCHIJMAN, A. G.; GÜRTLER, R. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. **Acta Tropica**, v. 126, p. 211-217, 2013.

FELIPE, I. M. A.; AQUINO, D. M. C.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M. D. C.; RANGEL, M. E. S.; BARBOSA, D. S.; BARRAL, A.; WERNECK, G. L.; CALDAS, A. J. M. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERREIRA, E.C.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MELO, L. A.; PEREIRA, A. A. S.; MADEIRA, F. A. M.; VALÉRIO, S. A. N.; CUNHA, H. M. PAGLIA, A. P. Mixed infection of *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **Veterinary Research**, v.11, n.71, p. 1-7, 2015.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Portal da Doença de Chagas: diagnóstico.** 2024. Acessado em: 15 out. 2024. Disponível em: https://chagas.fiocruz.br/doenca/diagnostico/

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B. G.; SERRA, O. P.; SILVA, E. O. R.; RABELLO, E. X. Nota sobre leishmaniose tegumentar no litoral sul do estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 7, p. 447-452, 1973.

FREITAS, Y. B. N.; SOUZA, C. S. F.; MAGALHÃES, J. M.; SOUSA, M. L. R.; D'ESCOFFIER, L. N.; VALLE, T. Z.; GONÇALVES, T. C. M.; GIL-SANTANA, H. R.; KAZIMOTO, T. A.; AMORA, S. S. A. Natural infection by Trypanosoma cruzi in triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio

Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 190-197, 2018.

FREITAS, N. E. M. Technological advances in the serological diagnosis of Chagas disease in dogs and cats: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 15, p. 343-363, 2022.

GALARDO, A. K. R.; GALARDO, C. D.; SILVEIRA, G. A.; RIBEIRO, K. A. N.; HIJAR, A. V.; OLIVEIRA, L. L.; SANTOS, T. V. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae): potential vectors of American cutaneous leishmaniasis agents in the area associated with the Santo Antônio Hydroelectric System in Western Amazonian, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 265-271, 2015.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 273, p. 1-13, 2018.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, p. 164-169, 2019.

GÜRTLER, R. E.; SOLARD, N. D.; LAURICELA, M. A.; HAEDO, A. S.; PIETROKOVSKI, S. M.; ALBERTI, A. A.; WISNIVESKY-COLLI, C. Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. III. Persistence of *T. cruzi* parasitemia among canine reservoirs in a two-year follow-up. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 213-219, 1986.

GÜRTLER, R. E.; CECERE, M. C.; CATANERA, M. B.; CANALE, D.; LAURICELLA, M. A.; CHUIT, R.; COHEN, J. E.; SEGURA, E. L. Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected human and dogs in northwest Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygene**, v. 55, n. 1, p. 24-31, 1996.

GÜRTLER, R. E.; CECERE, M. C.; LAURICELLA, M. A.; CARDINAL, M. V.; KITRON, U.; COHEN, J. E. Domestic dogs and cats as sources of Trypanosoma cruzi infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, v. 134, p. 69-82, 2007.

GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, v. 151, p. 32-50, 2015.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 52, p. 52-58, 2021.

GUIRALDI, L.M. **Pesquisa de tripanosomatídeos em primatas de cativeiro do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo**. 2016. 117f. Dissertação (Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2016.

HARTMANN, G.; ROMAN, I. J.; LORENZETTI, D. M.; HERBICHI, A. P.; MAZARO, R. D.; SANTOS, M. Y.; TONIN, A. A.; VOGEL, F. S. F.; FIGHERA, R. A. Anti-*Leishmania* spp. antibody detection in domestic cats from a visceral leishmaniasis transmission area. **Parasitology Research**, v. 122, p. 2631-2639, 2023.

HATAM, G. R.; ADNANI, S. J.; ASGARI, Q.; FALLAH, E.; MOTAZEDIAN, M. H.; SADJJADI, S. M.; SARKARI, B. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 313-316, 2010.

HERNANDES, C.; ALVAREZ, C.; GONZALEZ, C.; AYALA, M. S.; LEON, C. M.; RAMIREZ, D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 501, p. 1-7, 2014.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs Comparative application of traditional diagnosis methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 99-113, 2003.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 502, p. 1-25, 2018.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990-993, 2008.

KAUFER, A.; STARK, D.; ELLIS, J. A review of systematics, species identification and diagnosis of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 6, p. 449-460, 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 2016. (corrected proof). Doi: 10. 1093/molbev/msw054.

KRUSE, C. S.; GUERRA, D. A.; GELILLO-SMITH, R.; VARGAS, A.; KRISHNAN, L.; STIGLER-GRANADOS, P. Leveraging Technology to Manage Chagas Disease by Tracking Domestic and Sylvatic Animal Hosts as Sentinels: A Systematic Review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 5, 2019.

LAGO, J.; SILVA, J. A.; BORJA, L.; FRAGA, D. B. M.; SCHRIEFER, A.; ARRUDA, S.; LAGO, E.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Clinical and histopathologic

features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 7, 2019.

LAGO, J.; FRAGA, D.; COELHO, L.; JESUS, M. S.; LEITE, B.; WERNECK, G. L.; ARRUDA, S.; LAGO, E.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Dogs Harbor *Leishmania braziliensis* and Participate in the Transmission Cycle of Human Tegumentary Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 981, 2023.

LANA, M.; TAFURL, W. L.; CALIARI, M. V.; BAMBIRRA, E. A.; CHIARI, C. A.; LEITE, V. H. R.; BARBOSA, A. J. A.; TOLEDO, M. J. O.; CHIARI, E. Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 3, p. 113-121, 1988.

LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 34-47, 2013.

LEITE, R. M. Chagas Disease. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 16, n. 190, p. 19-29, 2019.

LONGONI, S. S.; MARIN, C.; SAURI-ARCEO, C. H.; LÓPEZ-CESPEDES, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; VILLEGAS, N.; ESCOBEDO-ORTEGÓN, J.; BARRERA-PÉREZ, M. A.; BOLIO-GONZALES, M. E.; SÁNCHEZ-MORENO, M. An Iron-Superoxide Dismutase Antigen-Based Serological Screening of Dogs Indicates Their Potential Role in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, México. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.7, 2011.

LONGONI, S. S.; LÓPEZ-CESPEDES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; SAURIARCEO, C. H.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; MARÍN, C. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**, v. 35, p. 469-476, 2012.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.

LUKES, J. The Tree of Life Web Project. **Trypanosomatida**. 2009a. Acessado em 20 nov. 19. Disponível em: http://tolweb.org/Trypanosomatida/98015/2009.01.02

LUKES, J. The Tree of Life Web Project. **Trypanosoma Gruby 1843**. 2009b. Acessado em 20 nov. 19. Disponível em: http://tolweb.org/Trypanosoma/98034/2009.01.02

MAIA-ELKHOURY, A. N.; LIMA, D. M.; SALOMÓN, O. D.; BUZANOVSKY, L. P.; SABOYÁ-DÍAZ, M. I.; VALADAS, S. Y. O. B.; SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J. Interaction

between environmental and socioeconomic determinants for cutaneous leishmaniasis risk in Latin America. **Pan American Journal of Public Health**, v. 45, 2021.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J. A. A review of Leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, p. 121-132, 2021.

MARCONDES, J. S.; FEITOSA, F. L. F.; IKEDA-GARCIA, F. A.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, M. M. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 20-24, 2006.

MARKLE, W. H.; MAKHOUL, K. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. **American Family Physician**, v. 69, n. 6, 2004.

MARTÍN-ESCOLANO, J.; MARÍN, C; ROSALES, M. J.; TSAOUSIS, A. D.; MEDINA-CARMONA, E.; MARTÍN-ESCOLANO, R. An Updated View of the Trypanosoma cruzi Life Cycle: InterventionPoints for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, p. 1107-1115, 2022.

MARTÍNEZ, M. F.; SANTINI, M. S.; KOWALEWSKI, M. M.; SALOMÓN, O. D. Phlebotominae in peri-domestic and forest environments inhabited by *Alouatta caraya* in northeastern Argentina. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 1, p. 1-8, 2019.

MEINECKE, C. K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kalazar) from na asymptomatic mother to her child. **American Academy of Pediatrics**, v. 104, n. 5, 1999.

MESSENGER, L. A.; BERN, C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, 2018.

MELO, S. N.; TEIXEIRA-NETO, R. G.; WERNECK, G. L.; STRUCHINER, C. J.; RIBEIRO, R. A. N.; SOUSA, L. R.; MELO, M. O. G.; CARVALHO-JÚNIOR, C. G.; PENAFORTE, K. M.; MANHANI, M. N.; AQUINO, V. V.; SILVA, E. S.; BELO, V. S. Prevalence of visceral leishmaniasis in a population of free-roaming dogs as determined by multiple sampling efforts: a longitudinal study analyzing the effectiveness of euthanasia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 161, p. 19-24, 2018.

METZDORF, I. P.; JUNIOR, M. S. C. L.; MATOS, M. F. C.; FILHO, A. F. S.; TSUJISAKI, R. A. S.; FRANCO, K. G.; SHAPIRO, J. T.; BORGES, F. A. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropic**a, v. 166, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Boletim Epidemiológico**. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. V. 50, n. 2, Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Boletim Epidemiológico**. Análise descritiva: um ano de implementação da notificação de doença de Chagas crônica no Brasil. v. 55, n. 8, Brasília: Ministério da Saúde, 2024.

MIRANDA, D. L. P.; RIBEIRO-JÚNIOR, G.; LANZA, F. C.; SANTOS, F. L. N.; REIS, R. B.; FRAGA, D. B. M.; SILVA, L. K.; SILVA-NETO, M. M.; SANTANA, I. J.; REIS, M. G. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among blood donors in the state of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. 146, 2019.

MISSAWA, N. A.; MACIEL, G. B. M. L.; RODRIGUES, H. Distribuição geográfica de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 369-373, 2008.

MOHAMMADBEIGI, A.; KHAZAEI, S.; HEIDARI, H.; ASGARIAN, A.; ARSANGJANG, S.; SAGHAFIPOUR, A.; MOHAMMADSALEHI, N.; ANSARI, H. Na investigation of the effects of environmental and ecologic factors on cutaneous leishmaniasis in the old world: a systematic review study. **De Gruyer**, v. 36, n. 1, p. 117-128, 2021.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009.

MONDAL, D.; BERN, C.; GHOSH, D.; RASHID, M.; MOLINA, R.; CHOWDHURY, R.; NATH, R.; GHOSH, P.; CHAPMAN, L. A. C.; ALIM, A.; BILBE, G.; ALVAR, J. Quantifying the Infectiousness of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Toward Sand Flies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 2, p. 251-258, 2019.

MONDOLFI, A. E. P.; GARMENDIA, A. C.; PÉREZ, Y. M.; HERNÁNDEZ-PEREIRA, C. E.; MEDINA, C.; VARGAS, F.; SANDOVAL, D.; AGUERO, J.; ROMÁN, D.; FORLANO-RIERA, M.; SALAS, Y.; PERAZA, M.; ROMERO, P.; ALDANA, F.; CASTILLO, T.; SANTELIZ, S.; PEREZ, G.; SUAREZ-ALVARADO, M. J.; MORALES-PANZA, R. J.; KATO. Autochthonous cutaneous leishmaniasis in urban domestic animals (*Felis catus* / *Canis lupus familiaris*) from central-western Venezuela. **Acta Tropica**, v. 191, 2019.

MOTA, T. F.; SOUSA, O. M. F.; SILVA, Y. J.; BORJA, L. S.; LEITE, B. M. M.; SOLCÀ, M. S.; MELO, D. A.; BRODSKYN, C. I.; DIAS, E. S.; VERAS, P. S. T.; FRAGA, D. B. M. Natural infection by Leishmania infantum in the Lutzomyia longipalpis population of an endemic coastal area to visceral leishmaniasis in Brazil is not associated with bioclimatic factors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, 2019.

NOVO, S.P.C.; LELES, D.; BIANUCCI, R.; ARAUJO, A. The process of *Leishmania* infection - disease and new perspectives of Paleoparasitology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 45, p.1-8, 2016.

NOYA, B. A.; GONZÁLEZ, O. N. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. **Acta tropica**, v. 151, p. 94-102, 2015.

NOYES H.A.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN, J.; PHELAN, J.; HOLZ, P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma bynneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. **International Journal for Parasitology.** v.29, p. 331-339, 1999.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; PEREIRA, V. F.; BENVENGA, G. U.; ALVES-MARTIN, M. F.; BENASSI, J. C.; SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A. Conjuntival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 220-222. 2015.

OLIVEIRA, E. F.; CASARIL, A. E.; FERNANDES, W. S.; RAVANELLI, M. S.; MEDEIROS, M. J.; GAMARRA, R. M.; PARANHOS-FILHO, A. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B. Monthly Distribution of Phlebotomine Sand Flies, and Biotic and Abiotic Factors Related to Their Abundance, in na Urban Area to Which Visceral Leishmaniasis Is Endemic in Corumbá, Brazil. **PLOS One**, v. 11, n. 10, 2016.

OLIVEIRA, A. R.; PINHEIRO, G. R. G.; TINOCO, H. P.; LOYOLA, M. E.; COELHO, C. M.; DIAS, E. S.; MONTEIRO, E. M.; SILVA, F. O. L.; PESSANHA, A. T.; SOUZA, A. G. M.; PEREIRA, N. C. L.; GONTIJO, N. F.; FUJIWARA, R. T.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis.* **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, 2019a.

OLIVEIRA, S. S.; HIRAMOTO, R. M.; RANGEL, O.; HENRIQUES, L. F.; JUNIOR, A. V.; TANIGUCHI, H. H.; BARBOSA, J. E. R.; CASANOVA, C.; SAMPAIO, S. M. P.; SPINOLA, R.; REHDER, S.; LINDOSO, J. A. L.; TOLEZANO, J. E. Epidemiological classification of the municipalities of the State of São Paulo according to the Visceral Leishmaniasis Control and Surveillance Program, 2018. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 16, n. 192, p. 29-46, 2019b.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, Nº 10 (Dezembro 2021).** 2021. Acessado em: 14 jan. 2025. Disponível em: https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas.** 2021. Acessado em: 7 nov. 2024. Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas.

PASA, S.; Vardali, A. T.; EROL, N.; KARAKUS, M.; TÖZ, S.; ATASOY, A.; BALCIOGLU, I. C.; TUNA, G. E.; ERMIS, O. V.; ERTABAKLAR, H.; ÖZBEL, Y. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3, p. 389-392, 2015.

PAHO. Pan American Health Organization. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas.** 2024. Acessado em: 10 out. 2024. Disponível em: https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170?show=full

PASSOS, L.A.C.; GUARALDO, A.M.A.; BARBOSA, R.L.; DIAS, V.L.; PEREIRA K.S.; SCHMIDT, S.L.; FRANCO, M.; ALVES, D.P. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. **Epidemiologia e serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 223-232, 2012.

PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLEGO, L. LeishVet update and recommendations on Feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 302, 2015.

PEREIRA, H. S.; SCOFIELD, A.; JÚNIOR, P. S. B.; SANTOS, D. L.; SIQUEIRA, J. S.; CHAVES, J. F.; CARDOSO, R. J.; LIMA, A. H. A.; SARMENTO, N. M. F. P.; JÚNIOR, F. S.; BARROS, F. N.; FARIAS, D. M.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; MENDES-OLIVEIRA, A. C.; RIET-CORREA, G.; CERQUEIRA, V. D. Chagas disease in urban and peri-urban environment in the Amazon: Sentinel hosts, vectors, and the environment. **Acta Tropica**, v. 217, 2021.

PERIS, M. P.; ESTEBAN-GIL, A.; ORTEGA-HÉRNANDEZ, P.; MORALES, M.; HALAIHEL, N.; CASTILLO, J. A. Comparative Study of Real-Time PCR (TaqMan Probe and Sybr Green), Serological Techniques (ELISA, IFA and DAT) and Clinical Signs Evaluation, for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in Experimentally Infected Dogs. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2627, 2021.

PETERSON, B.; BARNES, A. N. Feline-Human Zoonosis Transmission in North Africa: a Systematic Review. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 10, 2020.

PINHEIRO, M. P. G.; SILVA, M. M. M.; JÚNIOR, J. B. S.; SILVA, J. H. T.; XIMENES, M. F. F. M. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vectors of *Leishmania* protozoa, at an Atlantic Forest Conservation Unit in the municipality of Nísia Floresta, Rio Grande do Norte state, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 83, 2016.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 648-652, 2001.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

REIS, L. L.; BALIEIRO, A. A. S.; FONSECA, F. R.; GONÇALVES, M. J. F. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, 2007.

RODRIGUES, R. C. A.; ZUBEN, A. P. B.; LUCCA, T.; CASTAGNA, C. L.; NITSCHE, A.; PRESOTTO, D.; KEMP, B. From CCZ to UVZ: paradigm shift in the control of zoonoses. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 14, n. 162, p. 33-41, 2017.

ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C.; ROCHA, M. G.; DUARTE, A. C. M.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* Transmission Cycle Among Wild and Somestic Mammals in Three Areas of Orally Transmitted Chagas Disease Outbreacks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygene**, v. 79, n. 5, p. 742-749, 2008.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 251-262, 2014.

SAS Institute. 2015. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis of Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, v. 184. P. 54-66, 2018.

SCHNEIDER, M. C.; MUNOZ-ZANZI, C.; MIN, K.; ALDIGHIERI, S. Oxford Research Encyclopedia of Global Public Health. **"One Health" From Concept to Application in the Global World**. 2019. Acessado em: 16 out. 2024. Disponível em: https://oxfordre.com/publichealth/display/10.1093/acrefore/9780190632366.001.0001/acrefore-9780190632366-e-29

SERENO, D.; AKHOUNDI, M.; SAYEHMRI, K.; MIRZAEI, A.; HOLZMULLER, P.; LEJON, V.; WALECKX, E. Noninvasive Biological Samples to Detect and Diagnose Infectious due to Trypanosomatidae Parasites: A Systematic and Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, 2020.

SILVEIRA-NETO, I.; SOBRINHO, L. S. V.; MARTINS, C. O.; MACHADO, R. Z.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus.* **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3, p. 374-377, 2011.

SPADA, E.; PROVERBIO, D.; MIGLIAZZO, A.; PEPA, A. D.; PEREGO, R.; GIORGI, G. B. Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy. **ISRN Parasitology**, 2013.

STEINDEL, M.; PACHECO, L.C.P.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; CARVALHO-PINTO, C.J.; GRISARD, E.C. Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

STEVENS, J.; GIBSON, W. The evolution of salivarian trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 225-228, 1999.

SILVA, E. O. R.; WANDERLEY, D. M. V.; RODRIGUES, V. L. C. C. *Triatoma infestans*: importância, controle e eliminação da espécie no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, p. 73-88, 1998.

SILVA, R. A.; SAMPAIO, S. M. P.; KOYANAGUI, P. H.; POLONI, M.; CARVALHO, M. E.; RODRIGUES, V. L. C. C. Infestação por triatomíneos em assentamentos e reassentamentos rurais na Região do Pontal do Paranapanema, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 527-532, 2007.

SILVA, A. V. M.; MAGALHÃES, M. A. F. M.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in an endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. **Geospatial Health**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2011.

SILVA, J. C.; ZACARIAS, D. A.; SILVA, V. C.; ROLÃO, N.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction foe estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 517-522, 2016.

SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; KIKUTI, M.; MARSON, P.M.; LANGONI, H. Detection of *Leishmania* (*L.*) *infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific *primers*. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2017a.

SILVA, A. P. O.; MIRANDA, D. E. O.; SANTOS, M. A. B.; GUERRA, N. R.; MARQUES, S. R.; ALVES, L. C.; RAMOS, R. A. N.; CARVALHO, G. A. Phlebotomines in an area endemic for American cutaneous leishmaniasis in northeastern coast of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 280-284, 2017b.

SILVA, R. A.; ESTEVÃO, V. A. O.; DUARTE, A. N. Triatomines in the metropolitan region of São Paulo: entomological surveillance. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 16, n. 190, p. 13-18, 2019.

SILVA, S. S.; MACEDO, L. O.; OLIVEIRA, J. C. P.; ALVEZ, L. C.; CARVALHO, G. A.; RAMOS, R. A. N. Canine visceral leishmaniasis: risk factors and spatial analysis in an endemic area of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 2, 2023.

TENNEY, T. D.; CURTIS-ROBLES, R.; SNOWDEN, K. F.; HAMER, S. A. Shelter Dogs as Sentinels for *Trypanosoma cruzi* Transmission across Texas. **Emerging and Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1323-1326, 2014.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253-272, 2020.

TRAVI, B. L. Considering Dogs as Complementary Targets of Chagas Disease Control. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 2, p. 90-94, 2019.

URSINE, R. L.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F.; SANTOS, R. C.; SOARES, M. D.; GUSMÃO, M. S. F.; LEITE, M. E.; VIEIRA, T. M. American Tegumentary Leishmaniais in na endemic municipality in the North of Minas Gerais State: spatial analysis and socio-environmental factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, 2021.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

VIETTRI, M.; HERRERA, L.; AGUILAR, C. M.; MOROCOIMA, A.; REYES, J.; LARES, M.; LOZANO-ARIAS, D.; GARCÍA-ALZATE, R.; CHACÓN, T.; FELICIANGELI, M. D.; FERRER, E. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. **Veterinary Parasitology**: Regional Studies and Reports, v. 14, p. 123-130, 2018.

VILAS-BOAS, D. F.; NAKASONE, E. K. N.; GONÇALVES, A. A. M.; LAIR, D. F.; OLIVEIRA, D. S.; PEREIRA, D. F. S.; SILVA, G. G.; CONRADO, I. S. S.; RESENDE, L. A.; ZALDÍVAR, M. F.; MARIANO, R. M. S.; DUTRA, W. O.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; GALDINO, A. S.; SILVEIRA-LEMOS, D.; GIUNCHETTI, R. C. Global Distribution of Canine Visceral Leishmaniasis and the Role of the Dog in the Epidemiology of the Disease. **Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 455, 2024.

VIOTI, G.; SILVA, M. D.; GALVIS-OVALLOS, F.; ALVES, M. L.; SILVA, D. T.; LEONEL, J. A. F.; PEREIRA, N. W. B.; BENASSI, J. C.; SPADA, J. C. P.; MAIA, C.; GALATI, E. A. B.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 4, p. 2182-2190, 2021.

VIRREIRA, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; SOLANO, M.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital Trypanosoma cruzi infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 5, p. 574-582, 2003.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2015. Acessado em: 20 nov. 2023. Disponível em: htpp://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2016a. Acessado em: 20 nov. 2023. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/

WHO. World Health Organization. **Fact sheets: neglected tropical diseases.** 2016b. Acessado em: 20 nov. 2023. Disponível em: http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/en/

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. 2024. Acessado em: 15 out. 2024. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)

ZAMPIERI, R. A.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; MUXEL, S. M.; LIMA, A. C. S.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. High Resolution Melting Analysis Targeting *hsp70* as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 2016.

ZAPPAROLI, D.; BERTOZZO, T. V.; ALEXANDRINO, M.; SANCHES, D. F.; AIRES, I. N.; MANZINI, S.; MEDEIROS, M. I. M.; KUROKAWA, C. S.; SANTOS, R. M.; LUCHEIS, S. B. Commercially acquired açaí pulps contamination by *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 363, 2022.

ZECCA, I. B.; HODO, C. L.; SLACK, S.; AUCKLAND, L.; RODGERS, S.; KILLETS, K. C.; SAUNDERS, A. B.; HAMER, S. A. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection associated histologic findings in domestic cats (*Felis catus*). **Veterinary Parasitology**, v. 278, 2020.

ZUBEN, A. P. B.; DONALÍSIO, M. R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.

Manuscrito

Dogs and Cats Naturally Infected by *Trypanosoma cruzi* in Zoonosis Surveillance Units from Coastal Regions of Brazil

Isabella Neves Aires[a]*, Amanda Corvino Valim[b], Laís Pereira da Silva[b], Bruna dos Santos Leite[b], Marcos Vinícius Rangel[a], Bruna Lindolfo da Silva[c], João Pessoa Araújo Júnior[c], Antônio Carlos Paes[b], Virgínia Bodelão Richini Pereira[a,d], Simone Baldini Lucheis[a,b].

[a] São Paulo State University (UNESP), Medical School, Botucatu, Brazil.

[b] São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Botucatu, Brazil.

[c] São Paulo State University (UNESP), Institute of Biotechnology, Botucatu, Brazil.

[d] Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratories Center II, Bauru, Brazil.

*Correspondence: isabella.aires@unesp.br; +55 11 98668-5312; Av. Prof. Montenegro – Botucatu District, Brazil, Postal Code 18618-687.

Abstract

The Trypanosomatidae family includes protozoa of broad medical and veterinary interest that infect various vertebrates, including human beings, and use a range of insects as vector agents. The genus *Trypanosoma* includes *Trypanosoma cruzi* (*T.* cruzi) as its main species, the etiological agent of Chagas disease, which infects humans and animals, including domestic animals like dogs and cats, which can become infected during the blood meal of triatomine vectors. This study aimed to investigate *T. cruzi* in 161 blood samples from dogs and cats housed in Zoonoses Surveillance Units in six (06) municipalities on the coast of the state of São Paulo, Brazil. The samples were analyzed using the serological technique of Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for *T. cruzi*, and real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) using specific primers for *T. cruzi*. A spatial analysis of the distribution of positive cases in the different municipalities studied was also carried out. In the IFAT test, three (03) samples from dogs from the municipality of Guarujá were positive for *T. cruzi* (1.86%).

The qPCR reactions showed amplification of *T. cruzi* in 151 samples, with 51 testing positive (32.48%), belonging to all the municipalities studied. Thus, the identification of *T. cruzi* in domestic animals from Zoonoses Surveillance Units allowed the identification of possible reservoirs, enabling epidemiological surveillance in the region studied to establish preventive measures to reduce the risk of disease transmission to the resident population, employees of these institutions, and visitors to the coastal region of the state of São Paulo.

1 Introduction

The family Trypanosomatidae consists of a broad phylogenetic group that includes dozens of protozoan species from various genera, which are of medical, veterinary, and agricultural interest, as it includes agents causing severe neglected tropical diseases (Kaufer; Stark; Ellis, 2020). One of the most important genera in the Trypanosomatidae family is *Trypanosoma*, the most well-known species being *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the etiological agent of Chagas disease (WHO, 2016a). It is considered by the World Health Organization (WHO) as one of the 18 neglected tropical diseases (WHO, 2016b), with approximately six to eight million people infected throughout the Americas (PAHO, 2021). In Latin America, the annual number of deaths is approximately 12,000 to 14,000 (Miranda et al., 2019).

Among the various routes of disease transmission, vectorial transmission occurs through triatomines, which are hematophagous and transmit the parasite via feces and urine during the blood meal (WHO, 2024). With environmental degradation caused by humans, such as agricultural practices and urban expansion into rural areas, trypanosomes, particularly *T. cruzi*, which were previously confined to the sylvatic cycle, began having their vectors invade human dwellings. These vectors feed on the blood of domestic animals in the peridomicile, such as dogs, cats, goats, sheep, and especially birds like chickens, in addition to humans themselves (Coura, 2013).

Despite having a high morbidity and mortality, 70% of people with Chagas disease are unaware that they are infected, and only 1% receive proper treatment (PAHO, 2021). Regarding clinical manifestations in animals, most are asymptomatic during the acute phase of the disease; however, some may present signs such as fever, diarrhea, splenomegaly, and lymphadenopathy. Megacolon

and megaesophagus can also be observed in dogs, both in the acute and chronic phases of Chagas disease. Chronically infected dogs and cats may also develop progressive myocarditis, arrhythmias, and heart failure, which can lead to the animal's death (Freitas et al., 2022).

Zoonoses were mostly infectious diseases previously restricted to animals (excluding humans); however, ecological imbalance and urban expansion into regions sustaining the natural life cycle of parasites have resulted in human infection (Jones et al., 2008). About 70% of infectious diseases that threaten public health are related to animals, making zoonoses and the role of animals in the epidemiology of these diseases a significant concern for public health (Schneider et al., 2019).

Considering the relationship between environmental changes, the presence of animals and zoonotic vectors in rural and urban environments, and the risk of human infection, the One Health concept allows us to integrate human, animal, and environmental health to predict and control the transmission of zoonoses (Schneider et al., 2019). One Health promotes collaboration among different disciplines, professionals, and institutions, seeking comprehensive and effective solutions aimed at epidemiological surveillance and control of zoonoses, neglected tropical diseases, and vector-borne diseases (Brazil, 2024).

Among the institutions with an essential role in zoonosis control that can contribute to the establishment of One Health are the Zoonosis Surveillance Units (Rodrigues et al., 2017). The dogs and cats collected by these institutions are periodically handled by local veterinarians, allowing blood samples to be taken without causing unnecessary stress to these animals. In this study, we describe the occurrence of *T. cruzi* housed at Zoonosis Surveillance Units and the role of infected animals as reservoirs of the parasite, thus monitoring the transmission and demonstrating the epidemiological status of this zoonosis in the area studied.

2 Material and Methods

2.1 Ethical approval

This study was authorized by the Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Botucatu, State of São Paulo, Brazil, School of Medicine (protocol number 1434/2023).

2.2 Study location

The dogs and cats in this study were rescued from abandonment on the streets and animal abuse in municipalities located on the coast of the State of São Paulo, in the Southeastern Region of Brazil. These animals are housed in the Zoonoses Surveillance Units of the municipalities of Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Guarujá, São Sebastião, and Ubatuba. The municipalities are situated in an Atlantic Forest region, and the institutions where the animals are housed are located near vegetation fragments.

2.3 Samples

Blood samples were collected from 161 animals, including 115 dogs and 46 cats of both sexes and various ages, between July and November 2023. The number of dogs and cats per Zoonoses Surveillance Unit is described in Table 1.

2.4 Collection

Blood collection was performed by the responsible veterinarian of the institution when there was a need for animal handling, such as the administration of medications and clinical exams. The collection was done through peripheral venous puncture after asepsis with 70% alcohol. One aliquot of the collected blood was placed in Vacutainer® tubes containing EDTA for the molecular technique of qPCR, while a second aliquot was placed in a dry tube for serum extraction and the performance of the Indirect Immunofluorescence test technique.

2.5 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

DNA extraction from the blood samples was performed using the commercial kit Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen® Scientific®, USA), following the manufacturer's recommendations. The extracted DNA was quantified with the NanoVue Plus kit (GE Healthcare®) and submitted to quantitative polymerase chain reaction (qPCR). For qPCR, the GoTaq® qPCR Master Mix SYBR® Green kit (Promega) was used. The reactions were carried out in MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific), where each 0.1mL well received 3.4µL of ultrapure water, 10µL of the GoTaq® reagent, 0.8µL of each primer, and 5µL of the extracted sample, totaling 20µL.

To detect the DNA of *T. cruzi*, we used the primers TCZ1 5’CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT3’ and TCZ2 5’CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3’,

which amplify the parasite's nuclear DNA (Virreira et al., 2003). The plates underwent the cycling process and were read using the AriaMx Real-Time PCR (qPCR) Instrument (Agilent), with analysis performed by the Agilent Aria Mx software (2014-2019). For the standard curve, DNA samples from *T. cruzi* strains were used. The cycling profile consisted of an initial step at 95ºC for 5 minutes, followed by 40 cycles at 95ºC for 15 seconds and 60ºC for 1 minute, with fluorescence signals captured at the end of each cycle, as recommended by the manufacturer of the GoTaq qPCR Master Mix. The dissociation curve was analyzed at 95ºC for 30 seconds, followed by 65ºC for 30 seconds and 95ºC for 30 seconds, according to the equipment's standard protocol.

2.6 Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT)

For the performance of the serological technique, epimastigote forms of *T. cruzi* were used as antigens, maintained in Liver Infusion Tryptose (LIT) and Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) media at 25ºC. After confirming the growth of epimastigotes under an optical microscope, the parasites were quantified, using the antigen when 20 to 30 parasites per microscope field were observed in the evaluation of 50 µL of the antigen on a 24x60mm slide and coverslip.

The antigen slides were prepared by pipetting 10 µL of the *T. cruzi* epimastigote suspension into each well, then aspirating it, leaving only a thin film on each well. The slides were dried at room temperature and stored at -20ºC. A specific conjugate containing anti-IgG antibodies for dogs and cats was used, establishing a cutoff for screening positive animals for *T. cruzi* at a titer of 20. The IFAT was performed according to Camargo (1966).

2.6 Spatial Analysis

The spatial analysis was performed based on mapping the municipalities of the institutions with blood samples from dogs or cats positive for *T. cruzi* in at least one diagnostic technique, aiming to understand the spatial distribution of positive cases in the study area. For this, a Geographic Information System (GIS) tool was used, employing the QGIS 3.24.1 software.

3 Results

Of the 161 samples in the IFAT for *T. cruzi*, three animals from the municipality of Guarujá showed reactive samples with a titer of 20 (1.86%). In the molecular techniques, DNA extraction was

141 successful for 157 samples, which were then subjected to qPCR. For the TCZ1/TCZ2 primers, 151
142 showed amplification (96.18%), corresponding to 108 dogs and 43 cats, but only 51 in total were
143 positive for *T. cruzi* (32.48%), attributed to 25 dogs (51%) and 26 cats (49%), with a Cq value of 33
144 or less, which was established as the cutoff point (Supplementary File – Table 2). The positivity by
145 species in the qPCR for *T. cruzi* was more significant in cats, as 26 out of 43 tested samples were
146 positive (60.46%), while only 25 out of 108 dogs diagnosed were positive (23.15%).
147 Only 6 samples (3.82%) showed no contact with the parasite, belonging to dogs. In qPCR, all
148 municipalities had positive samples, corresponding to 25.81% of the total samples from the
149 municipality of Peruíbe; 54.83% of the samples tested in Itanhaém; 42.86% of the total in Mongaguá;
150 10.34% of the samples from the municipality of Guarujá; 27.78% of positive samples from the total
151 sampled in São Sebastião; and 33.33% of the total tested in Ubatuba, demonstrating the presence of
152 multiple acute infections of Chagas disease in all the municipalities sampled along the São Paulo
153 coastline.
154 The location of the municipality with a reactive sample in the IFAT is indicated in Figure 1. The
155 municipalities sampled in the study, and consequently those that presented positive samples for *T.*
156 *cruzi* in qPCR, are mapped in Figure 2. The map in Figure 3 shows the number of positive samples
157 for *T. cruzi* in qPCR by municipality studied.
158

159 ## 4 Discussion

160 These results support the hypothesis of the presence of vectors and the maintenance of the parasite's
161 life cycle in the region. Aside from the 51 acute infections detected by qPCR, the IFAT suggests the
162 presence of the chronic form of Chagas disease, as the detection of IgG antibodies indicates a late
163 immune response, and no detection occurred in the molecular test using blood samples from these
164 dogs. The dog is one of the most relevant reservoirs of *T. cruzi*, and detecting the parasite in these
165 animals allows for identifying areas of risk for disease transmission through control programs, even
166 before human cases are detected. These animals are classified as sentinels, as they are frequently
167 present in domestic and peridomestic environments, where the vectors also exist, making them good
168 indicators of parasite circulation (Gürtler et al., 2007). Furthermore, the analysis of infection rates in

sentinel animals allows for identifying the potential for parasite transmission to humans (Freitas et al., 2018).

Several studies show a high frequency of dogs infected by *T. cruzi*, with the prevalence of infection in these animals being higher than in humans. The presence of infected dogs in the domestic environment is associated with a higher risk of human infection (Travi, 2019). In the study by Gürtler and Cardinal (2015), more than 1,000 domestic triatomines were evaluated, showing that dogs had the highest blood meal infection rate (49%), followed by cats (39%) and humans (38%).

Regarding the presence of the parasite in cats, the role of felines in the transmission of Chagas disease remains insufficiently explored. T. cruzi can naturally infect cats; however, they are not considered as efficient reservoirs as dogs. Even so, they may contribute to maintaining the epidemiological cycle and serve as reservoirs for the protozoan, facilitating the infection of other animals and humans (Gürtler et al., 2007). When infected, they are usually asymptomatic, meaning that domestic felines can act as reservoirs, especially in endemic areas, for long periods before being diagnosed (Freitas et al., 2022).

Endemic in several regions of Brazil, including São Paulo state, Chagas disease is present in nearly 40% of the Brazilian territory (Moncayo; Silveira, 2009). The search for *T. cruzi* in dogs and cats can provide important epidemiological data about the transmission of this zoonosis in domestic and peridomestic environments. In addition to diagnosis, active entomological surveillance is also an essential tool for identifying the predominant vector species in a given region. The study by Freitas et al. (2018), conducted in Rio Grande do Norte, Brazil, evaluated the presence of trypanosomatids and the seroprevalence of *T. cruzi* in dogs, capturing 68 triatomines, the majority being from the species *Triatoma brasiliensis*, of which 41.2% were infected by *T. cruzi*, in addition to diagnosing 218 dogs, where 11% were positive for *T. cruzi*. Cruz and collaborators (2020) also verified the occurrence of *T. cruzi* in shelter dogs from Sergipe, Brazil, using primers TCZ1 and TCZ2 in cPCR. Out of 168 samples, 17 (10.1%) were positive, indicating *T. cruzi* infection in the region and highlighting the necessity of epidemiological surveillance of the zoonosis, as well as the importance of the One Health approach for the detection and monitoring of zoonotic diseases.

Domestic animals are a link between the sylvatic and domestic cycles of *T. cruzi*, playing a significant epidemiological role in zoonosis. Identifying the vector species helps to understand the disease's behavior and its risk of transmission to humans and domestic animals (Freitas et al., 2018). The study by Pereira et al. (2021), conducted in the Amazon, Brazil, reported the detection of a dog that tested positive after a year of a negative test, conducted when another dog from the same household died of acute Chagas disease, showing that the transmission cycle in the area is active, with the risk of transmission to other animals and humans.

Cantillo-Barraza and colleagues (2022) reported children, dogs, and synanthropic animals testing positive for *T. cruzi* in Colombia, and the presence of infected triatomines, highlighting the link between sylvatic transmission of *T. cruzi* and its domestic transmission to humans and domestic animals. Considered the main peridomestic reservoirs of *T. cruzi*, dogs have high parasitemia during the acute phase of the disease, acting as efficient reservoirs in maintaining the parasite's life cycle, making the diagnosis and control of transmission in these animals essential (Durães-Oliveira et al., 2024).

Gütler and collaborators (2007) monitored dogs and cats in northwestern Argentina through serology and xenodiagnosis, recording an infection rate of 60% for dogs and 42% for cats, with dogs showing an infectious capacity three times higher for triatomines compared to cats.

To improve epidemiological surveillance and support the control of Chagas disease in endemic areas, animal diagnosis is essential, especially with the use of sensitive and low-cost tests, providing important epidemiological data on *T. cruzi* reservoirs in these regions (Freitas et al., 2022).

Human actions, such as deforestation, particularly for the construction of housing developments, bring wild animals closer to humans, including triatomine vectors and the use of palm trees in landscaping projects brings vectors, possibly infected by wild mammals, closer to domestic animals and humans (Leite, 2019). One of the pillars of Chagas disease epidemiological surveillance is entomological investigation, as identifying infected vectors before reservoirs are established and humans are infected prevents the formation of colonies in homes and peridomestic environments, which is essential for maintaining the disease cycle (Brazil, 2005).

Considering this, it is suggested that active searches for triatomine vectors be conducted in the six municipalities tested, as well as diagnostic testing of these insects for the presence of *T. cruzi*,

providing further information on parasite transmission in the region. Since, in addition to detecting chronic infections through serological testing, molecular tests revealed the presence of many acute cases, characteristic of recent infections, indicating ongoing vector transmission and the probable presence of infected triatomines in the municipalities.

The large number of *T. cruzi* reservoirs in the wild environment throughout the Americas means that eradication of the infection is not feasible. However, public health authorities aim to eliminate transmission to humans, as well as the early diagnosis of infected individuals, and appropriate treatment and follow-up. Some of the World Health Organization's recommendations for preventing and controlling the disease related to vector transmission include: the development of educational materials contextualized to the geographical area and based on a One Health approach; the use of residual insecticides to spray homes and peridomestic areas; improvements in house infrastructure and proper cleaning to prevent infestations; personal preventive measures, such as using mosquito nets and proper hygiene in food preparation, storage, and consumption (WHO, 2024).

A limitation for diagnosing *T. cruzi* infections in the sampled animals is that only one blood sample was taken, considering that, for the IFAT serological test, it would be advisable to perform paired serology 15 to 20 days after the first sample to check for an increase in antibody titers. Additionally, collecting other biological materials, such as those from lymph nodes, or even, performing bone marrow puncture, would expand the possibility of detecting *Trypanosoma* genetic material, assisting in the analysis and discussion of the results. Furthermore, many animals had already been adopted during the research, making it not possible to collect a new sample to follow up on cases that were serologically positive and molecularly confirmed. In these cases, the veterinarians responsible for the institutions communicated with the new owners to carry out the tests. This situation could be another risk factor for the population, as these possibly infected animals are now in the household, in contact with other animals and humans, potentially acting as reservoirs for the parasite.

5 Conclusion

Due to the high circulation of people and the turnover of animals in Zoonosis Surveillance Units, our findings highlight the need for further research on the role of these institutions in maintaining the life

cycle of *T. cruzi* in urban environments. Implementing control measures for triatomines, such as installing traps, serves as an essential form of epidemiological surveillance. It also facilitates the diagnosis of dogs and cats housed in these institutions, contributing to the One Health approach.

Acknowledgments: To the support for obtaining the samples provided by the staff of the Zoonosis Surveillance Units in the municipalities of Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá, Guarujá, São Sebastião, and Ubatuba, Brazil.

Funding: This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant number 2023/00076-9] and by the Coordination of Superior Level Staff Improvement.

Declaration of interest: none.

References:

Brazil, Ministry of Health, 2024. One Health. https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/u/uma-so-saude (accessed 16 October 2024).

Brazil, Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat, 2005. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 38.

Cantillo-Barraza, O., Solis, C., Zamora, A., Herazo, R., Osorio, M.I., Garcés, E., Xavier, S., Mejía-Jaramillo, A.M., Triana-Chávez, O., 2022. Enzootic Trypanosoma cruzi infection by Rhodnius prolixus shows transmission to humans and dogs in Vichada, Colombia. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 12.

Camargo, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8, 227-234.

Coura, J.R., 2013. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108, 962-967.

Cruz, A.C.F.G., Santos, N.A.F., Jeraldo, V.L.S., Madi, R.R., Rosa, J.A., Melo, C.M., 2020. Shelter dogs as indicators for Trypanosoma cruzi infection in an urban area of Aracaju, Brazil. Acta Trop., 210.

Durães-Oliveira, J., Palma-Marques, J., Moreno, C., Rodrigues, A., Monteiro, M., Alexandre-Pires, G., Fonseca, I.P., Santos-Gomes, G., 2024. Chagas disease: a silent threat for dogs and humans. *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 3840.

Freitas, Y.B.N., Souza, C.S.F., Magalhães, J.M., Sousa, M.L.R., D'Escoffier, L.N., Valle, T.Z., Gonçalves, T.C.M., Gil-Santana, H.R., Kazimoto, T.A., Amora, S.S.A., 2018. Natural infection by Trypanosoma cruzi in triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 51, 190-197.

Freitas, N.E.M., 2022. Technological advances in the serological diagnosis of Chagas disease in dogs and cats: a systematic review. *Parasites Vectors*, 15, 343-363.

Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Cardinal, M.V., Kitron, U., Cohen, J.E., 2007. Domestic dogs and cats as sources of Trypanosoma cruzi infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134, 69-82.

Gürtler, R.E., Cardinal, M.V., 2015. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of Trypanosoma cruzi. *Acta Trop.*, 151, 32-50.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990-993.

Kaufer, A., Stark, D., Ellis, J., 2020. A review of systematics, species identification and diagnosis of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. *Int. J. Parasitol.*, 50, 449-460.

Leite, R.M., 2019. Chagas disease. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*, 16, 19-29.

Miranda, D.L.P., Ribeiro-Júnior, G., Lanza, F.C., Santos, F.L.N., Reis, R.B., Fraga, D.B.M., Silva, L.K., Silva-Neto, M.M., Santana, I.J., Reis, M.G., 2019. Seroprevalence of Trypanosoma cruzi infection among blood donors in the state of Bahia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 52, 146.

Moncayo, A., Silveira, A.C., 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance, and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 17-30.

Pan American Health Organization, 2021. 70% of people with Chagas don't know they're infected. https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas (accessed 7 November 2024).

Pereira, H.S., Scofield, A., Júnior, P.S.B., Santos, D.L., Siqueira, J.S., Chaves, J.F., Cardoso, R.J., Lima, A.H.A., Sarmento, N.M.F.P., Júnior, F.S., Barros, F.N., Farias, D.M., Guimarães, R.J.P.S., Mendes-Oliveira, A.C., Riet-Correa, G., Cerqueira, V.D., 2021. Chagas disease in urban and peri-urban environment in the Amazon: sentinel hosts, vectors, and the environment. *Acta Trop.*, 217.

Rodrigues, R.C.A., Zuben, A.P.B., Lucca, T., Castagna, C.L., Nitsche, A., Presotto, D., Kemp, B., 2017. From CCZ to UVZ: paradigm shift in the control of zoonoses. *Bol. Epidemiol. Paul.*, 14, 33-41.

335 Schneider, M.C., Munoz-Zanzi, C., Min, K., Aldighieri, S., 2019. "One Health" From Concept to
336 Application in the Global World. *Oxford Res. Encycl. Glob. Public Health*.
337 https://oxfordre.com/publichealth/display/10.1093/acrefore/9780190632366.001.0001/acrefore-
338 9780190632366-e-29 (accessed 16 October 2024).
339
340 Travi, B.L., 2019. Considering dogs as complementary targets of Chagas disease control. *Vector*
341 *Borne Zoonotic Dis.*, 19, 90-94.
342
343 Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y., Svoboda, M., 2003.
344 Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital
345 Trypanosoma cruzi infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68, 574-582.
346
347 World Health Organization, 2016a. Chagas disease (American trypanosomiasis).
348 https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/ (accessed 20 November 2023).
349
350 World Health Organization, 2016b. Fact sheets: neglected tropical diseases.
351 https://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/en/ (accessed 20 November
352 2023).
353
354 World Health Organization, 2024. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis).
355 https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)
356 (accessed 15 October 2024).
357
358 Tables:
359
360 **Table 1.** Number of blood samples collected from dogs and cats in each Zoonoses Surveillance Unit
361 in the coastal region of São Paulo, Brazil.

Zoonosis Surveillance Unit	Number of dog samples	Number of cat samples	Total
Peruíbe	20	11	31
Itanhaém	8	23	31
Mongaguá	20	1	21
Guarujá	30	0	30
São Sebastião	17	4	21
Ubatuba	20	7	27
Total	115	46	161

Figures:

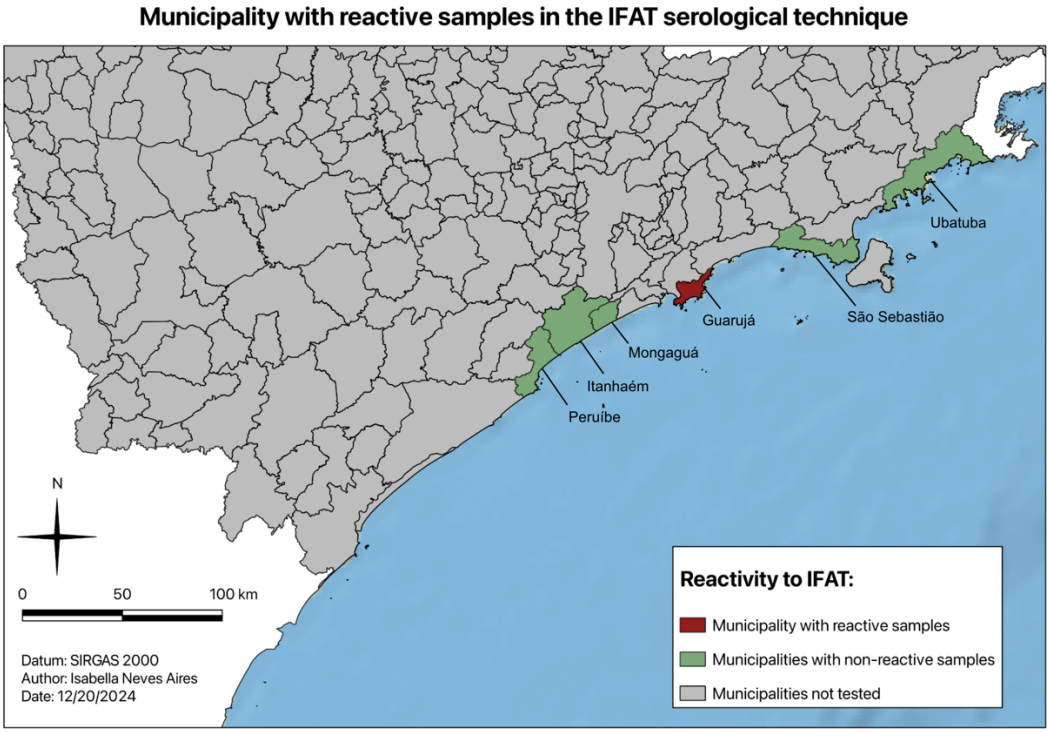
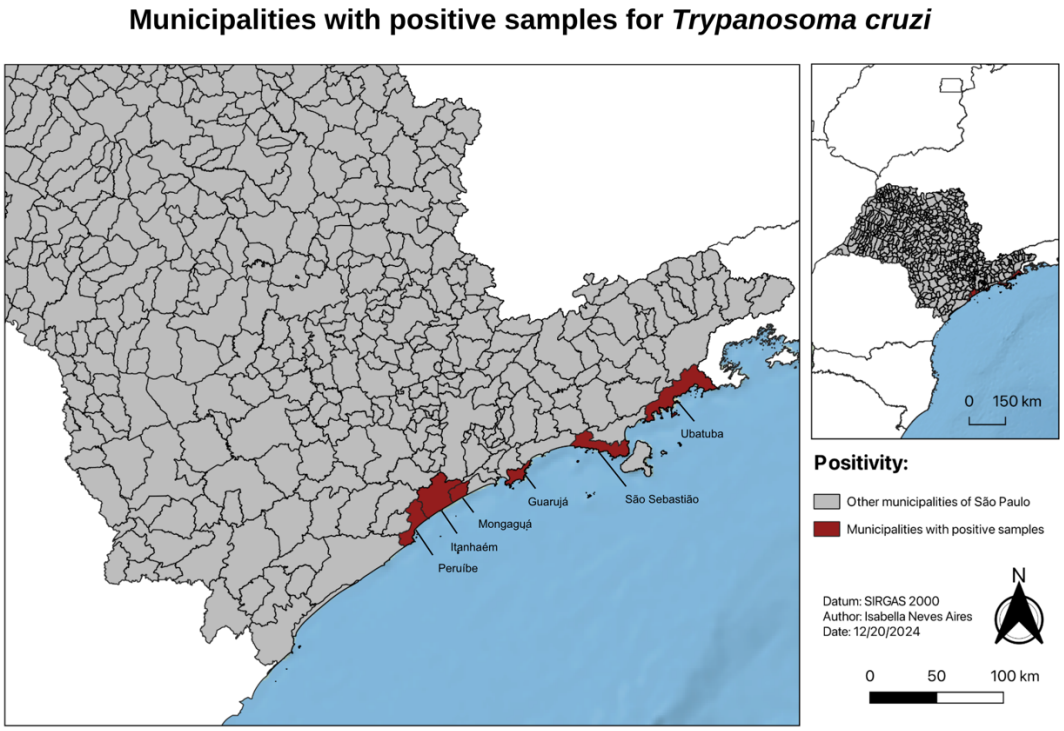
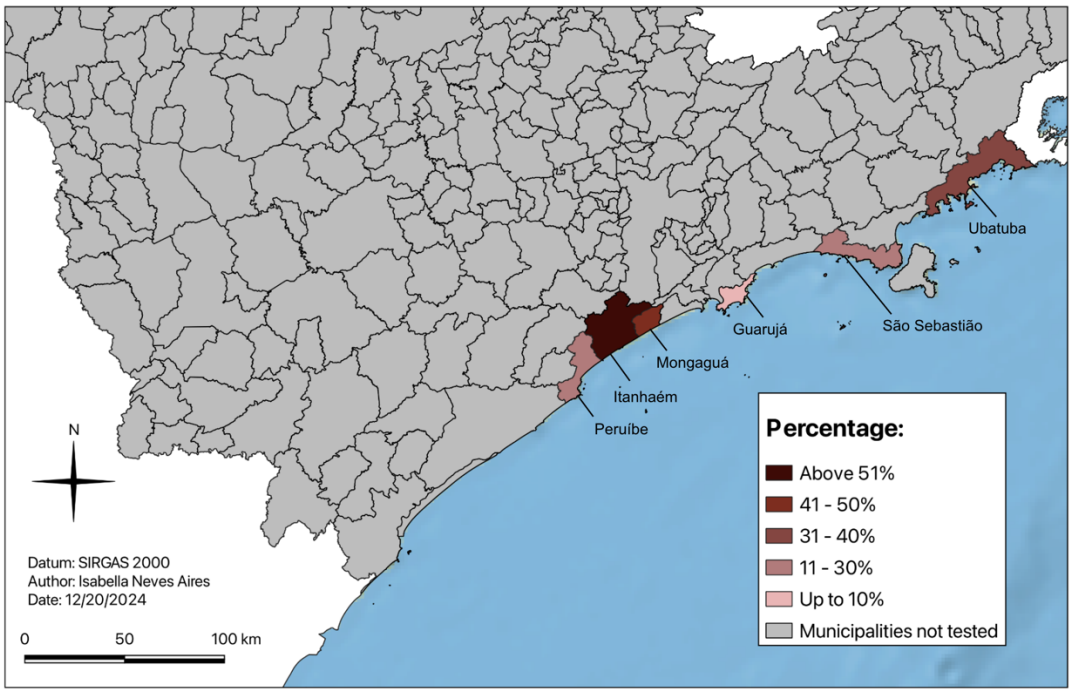


Figure 1. Map of municipalities that presented reactive samples for the serological technique of IFAT for *Trypanosoma cruzi* in the coastal region of São Paulo, Brazil. Source: QGis.



367

368 **Figure 2.** Map of municipalities that presented positive samples for *Trypanosoma cruzi* in the
369 coastal region of São Paulo, Brazil. Source: QGis.



370

371 **Figure 3.** Map with the percentage of positive samples in qPCR for *Trypanosoma cruzi* by municipality
372 in the coastal region of São Paulo, Brazil. Source: QGis.

373 Supplementary Files:

374

375 **Table 2.** List of positive samples to qPCR for *Trypanosoma cruzi* by municipalities in coastal areas
376 from Brazil.

Sample	Species	Municipality	Ct (Threshold cycle)	Melting temperature (ºC)
2P	Canine	Peruíbe	32,37	81
9P	Canine	Peruíbe	33	81,5
12P	Canine	Peruíbe	32,49	81,5
18P	Canine	Peruíbe	32,89	80,5
23P	Feline	Peruíbe	32,76	82,5
24P	Feline	Peruíbe	32,63	81,5
25P	Feline	Peruíbe	32,78	82,5
26P	Feline	Peruíbe	30,61	82,5
2G	Canine	Guarujá	32,82	81,5
4G	Canine	Guarujá	31,29	82
25G	Canine	Guarujá	32,85	84
4M	Canine	Mongaguá	32,72	84,5
7M	Canine	Mongaguá	31,88	81,5
8M	Canine	Mongaguá	32,96	81,5
13M	Canine	Mongaguá	30,98	81
17M	Canine	Mongaguá	31,47	84
18M	Canine	Mongaguá	31,78	81,5
19M	Canine	Mongaguá	32,64	82
20M	Canine	Mongaguá	32,43	81,5
21M	Feline	Mongaguá	32,35	81,5
2U	Feline	Ubatuba	31,48	81
3U	Feline	Ubatuba	32,96	81,5
4U	Feline	Ubatuba	30,75	84,5
5U	Feline	Ubatuba	31,96	81,5
6U	Feline	Ubatuba	30,07	84,5
7U	Feline	Ubatuba	32,07	84
20U	Canine	Ubatuba	31,88	84
22U	Canine	Ubatuba	32,03	84
25U	Canine	Ubatuba	32,96	81
5S	Canine	São Sebastião	31,04	84
7S	Canine	São Sebastião	32,08	83,5
12S	Canine	São Sebastião	30,56	83,5
13S	Canine	São Sebastião	31,77	83,5

19S	Feline	São Sebastião	31,03	83,5
2I	Canine	Itanhaém	32,6	82
3I	Canine	Itanhaém	30,44	82
4I	Canine	Itanhaém	32,56	82
7I	Feline	Itanhaém	30,44	83,5
8I	Feline	Itanhaém	29,81	83,5
9I	Feline	Itanhaém	31	83,5
11I	Feline	Itanhaém	32,85	86
12I	Feline	Itanhaém	31,72	81,5
13I	Feline	Itanhaém	32,31	87
19I	Feline	Itanhaém	31,19	84
21I	Feline	Itanhaém	32,35	82,5
22I	Feline	Itanhaém	30,83	82
23I	Feline	Itanhaém	32,27	84
24I	Feline	Itanhaém	31,42	84,5
25I	Feline	Itanhaém	32,18	86,5
26I	Feline	Itanhaém	31,54	83
30I	Feline	Itanhaém	31,38	85

377

Anexos

10 ANEXOS

10.1 Anexo I

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada pela da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1434/2023 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Estudo epidemiológico para Leishmania spp. E trypanosoma cruz Em cães e gatos do litoral do Estado de São Paulo"** conduzido pela Pesquisadora: **Isabella Neves Aires** – Orientadora: Profa. Simone Baldini Lucheis – Coorientadora: Profa. Maria Izabel Merino de Medeiros, registrado com o **nº 1434/2023**, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária em 26 de setembro de 2023.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	25/09/2025
Espécie/Linhagem/Raça	Cães e Gatos
Nº Total de animais	240 AMOSTRAS DE SANGUES
Idade/Peso	----------
Sexo	Ambos os Sexos

Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

The research project registered by the number 1434/2023 is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School – São Paulo State University (UNESP) on 26/September/2023.

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18618-970 Fones: (14) 3880.1880 – E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br/sara.sampaio@unesp.br

10.2 Anexo II

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais
MIP
FMB-UNESP
BOTUCATU, SP - RUBIÃO JR - CEP 18618-970 -- E-MAIL pg.doencastropicais.fmb@unesp.br
FONE 0**14 3811-6379 -- FAX 0**14 3815-9898

Peruíbe, 26 de Agosto de 2022.

Eu, _____, venho por meio deste autorizar a coleta de amostras de sangue de cães e gatos alocados na Unidade de Vigilância em Zoonoses da cidade de Peruíbe-SP, para o a realização do projeto de Doutorado intitulado "Estudo Epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo", a ser desenvolvido pela aluna Isabella Neves Aires, sob orientação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, junto ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

_____
Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe-SP

10.3 Anexo III

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais
MIP
Moléstias Infecciosas e Parasitárias
FMB-UNESP

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JR - CEP 18618-970 – E-MAIL pg.doencastropicais.fmb@unesp.br
FONE 0**14 3811-6379 – FAX 0**14 3815-9898

Itanhaém, 01 de Setembro de 2022.

Eu, William Tadeu Ramos de Souza, venho por meio deste autorizar a coleta de amostras de sangue de cães e gatos alocados no Departamento de Proteção e Bem-estar Animal de Itanhaém-SP, para o a realização do projeto de Doutorado intitulado "Estudo Epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo", a ser desenvolvido pela aluna Isabella Neves Aires, sob orientação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, junto ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

Departamento de Proteção e Bem-estar Animal de Itanhaém-SP

William Tadeu Ramos de Souza
Dept. de Proteção e Bem-Estar de Animais Domésticos

10.4 Anexo IV

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

MIP
Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
FMB-UNESP

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JR - CEP 18618-970 – E-MAIL pg.doencastropicais.fmb@unesp.br
FONE 0**14 3811-6379 – FAX 0**14 3815-9898

Mongaguá, 01 de Setembro de 2022.

Eu, KELLY L CAPATTO, venho por meio deste autorizar a coleta de amostras de sangue de cães e gatos alocados na Unidade de Vigilância em Zoonoses da cidade de Mongaguá-SP, para o a realização do projeto de Doutorado intitulado "Estudo Epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo", a ser desenvolvido pela aluna Isabella Neves Aires, sob orientação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, junto ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

DRA. KELLY CAPATTO
Diretoria da Unidade de Vigilância
de Zoonoses de Mongaguá/SP

Unidade de Vigilância em Zoonoses de Mongaguá-SP

10.5 Anexo V

PREFEITURA DE
Guarujá
Prefeitura Municipal de Guarujá
Estado de São Paulo
Secretaria de Saúde

Oficio Sesau: nº 303/ 2022

Guarujá, 29 de agosto de 2022.

Assunto: Autorização para realização de Pesquisa

Autorizamos a realização de pesquisa com o título: "Estudo epidemiológico para Leishmania spp. e Trypanosoma cruzi em cães e gatos do litoral do Estado de São Paulo", a ser desenvolvido pela aluna Isabella Neves Aires, junto ao Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP, orientada por Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, junto à Diretoria do Bem Estar Animal e o Centro de Zoonoses da Secretaria de Saúde. A pesquisadora e deverá disponibilizar o resultado da pesquisa em formato físico no prazo de dois meses após sua conclusão.

Despedimo-nos com os votos de elevada estima e consideração.

Atenciosamente.

Giuliano Altieri Vidotto
Secretário de Saúde

A/C Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP

10.6 Anexo VI

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais
MIP
Moléstias Infecciosas e Parasitárias
FMB-UNESP

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JR - CEP 18618-970 – E-MAIL pg.doencastropicais.fmb@unesp.br
FONE 0**14 3811-6379 – FAX 0**14 3815-9898

São Sebastião, 01 de Setembro de 2022.

Eu, Marcella Christoff, venho por meio deste autorizar a coleta de amostras de sangue de cães e gatos alocados no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Sebastião-SP, para o a realização do projeto de Doutorado intitulado "Estudo Epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo", a ser desenvolvido pela aluna Isabella Neves Aires, sob orientação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, junto ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

Marcella Christoff
Matrícula: 725165-3
Chefe Div. Vig. Saúde Animal e Ambiental Costa Sul

Centro de Controle de Zoonoses de São Sebastião-SP

10.7 Anexo VII

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Moléstias Infecciosas e Parasitárias
FMB-UNESP

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JR - CEP 18618-970 – E-MAIL pg.doencastropicais.fmb@unesp.br
FONE 0**14 3811-6379 – FAX 0**14 3815-9898

Ubatuba, 01 de Setembro de 2022.

Eu, Joana Pedro Gonçalves, venho por meio deste autorizar a coleta de amostras de sangue de cães e gatos alocados no Centro de Controle de Zoonoses de Ubatuba-SP, para o a realização do projeto de Doutorado intitulado "Estudo Epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo", a ser desenvolvido pela aluna Isabella Neves Aires, sob orientação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, junto ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

Dra Joana Pedro Gonçalves
Médica Veterinária
CRMV/SP 32127
Supervisão de Vigilância em Saúde
CCZ

Centro de Controle de Zoonoses de Ubatuba-SP

Dra Joana Pedro Gonçalves
Médica Veterinária
CRMV/SP 32127
Supervisão de Vigilância em Saúde
CCZ

10.8 Anexo VIII

Manutenção dos antígenos de *Leishmania* (*L.*) *infantum* (MHOM/BR/IOC/L2906), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566) e *Trypanosoma cruzi* (Cepa "Y")

Os antígenos de promastigotas foram mantidos em tubos rosqueados contendo-se 10mL do meio LIT acrescidos de 5mL do meio NNN. Os repiques de manutenção foram realizados a cada quinze dias, no interior de capela de fluxo laminar, transferindo-se uma alíquota do tubo de manutenção mais recente (repique anterior) e observando-se uma gota entre lâmina e lamínula em microscopia óptica no aumento de 40X a fim de se avaliar o crescimento e motilidade das formas promastigotas. Dos tubos em que apresentar maior quantidade e melhor motilidade, repica-se uma alíquota de 1mL para dois novos tubos contendo LIT e NNN. As culturas devem ser mantidas em estufa B.O.D à 26ºC (considerada temperatura ideal para crescimento e desenvolvimento dos antígenos).

10.9 Anexo IX

Protocolo da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)[1]:

1. A primeira diluição (1:20) foi realizada em uma microplaca com 190µL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 e 10µL do soro das amostras (utilizada na triagem para *Trypanosoma cruzi*);
2. Para a coluna seguinte é pipetado 100µL da primeira diluição em 100µL de PBS, obtendo a diluição de 1:40 (utilizada na triagem para *Leishmania* spp.);
3. Nas lâminas sensibilizadas distribui-se 10µL de soro diluído da primeira diluição para as lâminas sensibilizadas com *Trypanosoma cruzi* e da segunda diluição para as lâminas sensibilizadas com *Leishmania* spp.);
4. As lâminas são incubadas em câmara úmida à 37ºC durante 30 minutos;
5. As lâminas são mergulhadas em PBS durante 10 minutos, em seguida o PBS do recipiente é trocado e as lâminas permanecem por mais 10 minutos;
6. Secar as lâminas em estufa;
7. São adicionados os conjugados específicos diluídos em solução de Azul de Evans a 20%, sendo 10µL por poço do conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de cão (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) para as lâminas contendo soro de cão e 10µL por poço do conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de gato (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) para as lâminas com soro de gato;
8. As lâminas são incubadas novamente em câmara úmida a 37ºC por 30 minutos;
9. São realizadas mais duas lavagens com PBS por 10 minutos e em seguida as lâminas são secas em estufa;
10. Para a montagem das lâminas é utilizado glicerina tamponada pH 8,5, sendo cobertas com lamínulas de 24x60mm;
11. As lâminas são examinadas em microscópio de imunofluorescência no aumento de 40X. As amostras de soro foram consideradas positivas em titulação igual a 20 para *Trypanosoma cruzi* e 40 para *Leishmania* spp.;
12. Os soros positivos continuaram a ser avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) para se determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, anti-*Leishmania* (*L.*) *infantum* e anti-*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

[1]CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 8, p. 227-234, 1966.

10.10 Anexo X

Protocolo de extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em sangue com kit comercial Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen® Scientific®, USA):

1. Descongelar as amostras de sangue armazenadas em microtubos sob placas de gelo reciclável;
2. Em microtubos livres de DNAses e RNAses, acrescerntar 20µL de proteinase K juntamente com 300µL da amostra de sangue;
3. Homogeneizar em vórtex durante 10 segundos;
4. Adicionar 400µL de solução de lise (Lysis buffer);
5. Homogeneizar no vórtex por mais 15 segundos;
6. Deixar os tubos em temperatura ambiente por um período de 10 minutos;
7. Transferir o conteúdo para um tubo coletor junto à uma coluna de extração;
8. Centrifugar à 11000rcf por um minuto;
9. Descartar o líquido do tubo coletor;
10. Acrescentar 500µL de solução de lise à coluna;
11. Centrifugar à 11000rcf por um minuto;
12. Descartar o líquido do tubo coletor;
13. Acrescentar 500µL de solução de lavagem (Wash Buffer) à coluna;
14. Centrifugar à 11000rcf por três minutos;
15. Desprezar o tubo coletor e o sobrenadante e colocar a coluna em um microtubo de 1,5mL estéril;
16. Adicionar 100µL de solução de eluição (Elution Buffer) previamente aquecido à 70ºC;
17. Incubar por um minuto;
18. Centrifugar o microtubo à 11000rcf por um minuto;
19. Descartar a coluna de extração e armazenar a amostra de DNA extraída sob refrigeração à -20ºC até o momento de uso.

10.11 Anexo XI

Para verificar da quantidade de DNA extraído das amostras, estas foram submetidas ao quantificador NanoVue® Plus, da GE Healthcare. Ao ligar o aparelho é necessária a calibração, que foi realizada utilizando-se 2µL de água ultrapura. Com o aparelho calibrado, acrescentou-se 2µL de cada amostra de DNA extraído e iniciou-se a leitura do aparelho para obtenção dos resultados. Além da concentração de DNA na amostra, apresentada em µg/mL, o aparelho também fornece uma estimativa de pureza da amostra, demonstrada pela relação A260/280. Essa estimativa é feita pela razão entre a absorção de luz dos ácidos nucleicos, que ocorre em um comprimento de onda eletromagnético equivalente à 260nm, e a absorção de luz das proteínas, com comprimento de onda eletromagnético de 280nm. Para este parâmetro, valores entre 1,6 a 2,0 são considerados aceitáveis para DNA, porém valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas, enquanto valores acima de 1,8 podem indicar excesso de RNA[2].

[2] TURNER, P. C.; MCLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. **Instants notes in molecular biology.** UK: Guildford Biddles, 1997. 307 p.

10.12 Anexo XII

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Moléstias Infecciosas e Parasitárias
FMB-UNESP

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JR - CEP 18618-970 – E-MAIL pg.doencastropicais.fmb@unesp.br
FONE 0**14 3811-6379 – FAX 0**14 3815-9898

Botucatu, 22 de outubro de 2024.

O presente ofício apresenta os resultados da pesquisa "Estudo Epidemiológico para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos do litoral do estado de São Paulo", para as amostras de cães e gatos coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe, a fim de informar o médico veterinário responsável pela instituição, para que, se necessário, sejam tomadas medidas para impedir a circulação dos parasitos no local.

Apresentamos dados ainda não publicados e a divulgação não deve ser feita sem a autorização dos autores desta pesquisa, sendo destinado apenas à circulação interna. Todos os detalhes poderão ser lidos na dissertação de mesmo título, disponibilizada no Repositório da UNESP. Os resultados a seguir não devem ser utilizados para a realização de tratamento ou eutanásia do animal, sendo indicada a realização de exames complementares por um médico veterinário para confirmação do diagnóstico.

Quadro 1. Resultados positivos das técnicas diagnósticas realizadas nos animais da UVZ de Peruíbe.

Amostra	Espécie	Nome ou número do microchip	Sorologia (RIFI)	PCR convencional	PCR tempo real
6P	Cão	Preto	Negativo	Positivo para *Leishmania infantum*	Resultados ainda não disponíveis

Apesar do animal estar assintomático no momento da coleta, a utilização de coleira repelente e isolamento do animal é recomendada, uma vez que ele pode servir de reservatório para o parasito no local. Todos os animais não mencionados acima apresentaram-se negativos para todas as técnicas realizadas para *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *Leishmania* (Viannia) braziliensis.

Agradecemos à Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe, ao Dr. Raphael e à Dra. Mayra pela colaboração e disponibilidade para a coleta das amostras.

Isabella Neves Aires (mestranda)

Dra. Simone Baldini Lucheis (orientadora)

10.13 Anexo XIII

Tabela 3. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Peruíbe.

Amostra	Espécie	Gênero	Idade	Observação
1P	C	F	A	
2P	C	M	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3P	C	M	A	
4P	C	M	A	
5P	C	M	A	
6P	C	M	A	Positivo na cPCR para *Leishmania infantum*
7P	C	F	A	
8P	C	M	A	
9P	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
10P	C	F	A	
11P	C	F	I	
12P	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
13P	C	M	A	
14P	C	M	A	
15P	C	M	A	
16P	C	M	A	
17P	C	M	A	
18P	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
19P	C	M	F	
20P	C	M	F	

21P	G	M	I	
22P	G	M	A	
23P	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
24P	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
25P	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26P	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
27P	G	M	A	
28P	G	M	A	
29P	G	M	A	
30P	G	F	I	
31P	G	M	A	
Legenda:	C - Cão G - Gato	F - Fêmea M - Macho	F - Filhote A - Adulto I - Idoso	

10.14 Anexo XIV

Tabela 4. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Itanhaém.

Amostra	Espécie	Gênero	Idade	Observação
1I	C	M	A	
2I	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3I	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
4I	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5I	C	M	A	
6I	C	F	A	
7I	G	F	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8I	G	F	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
9I	G	M	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
10I	G	M	A	
11I	G	M	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
12I	G	M	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
13I	G	F	F	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
14I	G	M	A	
15I	G	F	F	
16I	G	F	A	
17I	C	M	A	
18I	C	M	A	

19I	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
20I	G	F	A	
21I	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
22I	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
23I	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
24I	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
25I	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26I	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
27I	G	M	A	
28I	G	F	A	
29I	G	F	A	
30I	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
31I	G	F	A	
Legenda:	C - Cão G - Gato	F - Fêmea M - Macho	F - Filhote A - Adulto I - Idoso	

10.15 Anexo XV

Tabela 5. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Mongaguá.

Amostra	Espécie	Gênero	Idade	Observação
1M	C	M	A	
2M	C	M	A	
3M	C	M	A	
4M	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5M	C	M	I	
6M	C	F	I	
7M	C	M	I	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8M	C	F	I	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
9M	C	F	I	
10M	C	M	I	
11M	C	M	I	
12M	C	M	I	
13M	C	M	I	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
14M	C	F	I	
15M	C	M	A	
16M	C	M	A	
17M	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
18M	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
19M	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*

20M	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
21M	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
Legenda:	C - Cão G - Gato	F - Fêmea M - Macho	F - Filhote A - Adulto I - Idoso	

10.16 Anexo XVI

Tabela 6. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses do Guarujá.

Amostra	Espécie	Gênero	Idade	Observação
1G	C	M	I	
2G	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3G	C	M	I	
4G	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5G	C	F	A	
6G	C	M	I	
7G	C	F	A	
8G	C	F	F	
9G	C	F	A	
10G	C	M	F	
11G	C	M	A	
12G	C	F	A	
13G	C	F	A	Reagente para *T. cruzi* à RIFI
14G	C	F	A	Reagente para *T. cruzi* à RIFI
15G	C	F	A	
16G	C	F	A	Reagente para *T. cruzi* à RIFI
17G	C	F	A	
18G	C	F	A	
19G	C	F	A	
20G	C	M	A	

21G	C	M	A	
22G	C	F	A	
23G	C	M	A	
24G	C	F	A	
25G	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26G	C	M	A	
27G	C	F	A	
28G	C	M	I	
29G	C	M	A	
30G	C	F	A	
Legenda:	C - Cão	F - Fêmea M - Macho	F - Filhote A - Adulto I - Idoso	

10.17 Anexo XVII

Tabela 7. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de São Sebastião.

Amostra	Espécie	Gênero	Idade	Observação
1S	C	F	A	
2S	C	M	I	
3S	C	M	A	
4S	C	M	I	
5S	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
6S	C	F	A	
7S	C	M	I	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8S	C	M	A	
9S	C	F	A	
10S	C	M	A	
11S	C	M	F	
12S	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
13S	C	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
14S	C	M	A	
15S	C	F	A	
16S	C	F	A	
17S	C	M	A	
18S	G	F	A	
19S	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
20S	G	F	A	

21S	G	F	A	
Legenda:	C - Cão G - Gato	F - Fêmea M - Macho	F - Filhote A - Adulto I - Idoso	

10.18 Anexo XVIII

Tabela 8. Informações complementares das amostras de sangue coletadas na Unidade de Vigilância em Zoonoses de Ubatuba.

Amostra	Espécie	Gênero	Idade	Observação
1U	G	M	A	
2U	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3U	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
4U	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5U	G	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
6U	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
7U	G	M	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8U	C	M	A	
9U	C	F	A	
10U	C	M	A	
11U	C	M	I	
12U	C	M	A	
13U	C	F	A	
14U	C	M	A	
15U	C	F	A	
16U	C	M	I	
17U	C	M	F	
18U	C	M	A	
19U	C	M	A	

20U	C	F	A	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
21U	C	M	I	
22U	C	M	I	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
23U	C	M	I	
24U	C	M	A	
25U	C	M	I	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26U	C	M	I	
27U	C	M	I	
Legenda:	C - Cão G - Gato	F - Fêmea M - Macho	F - Filhote A - Adulto I - Idoso	

10.19 Anexo XIX

Tabela 9. Quantificação do DNA das amostras de sangue extraídas.

Amostra	[ ] (µg/ml)	A260/A280	A260/A230	Observação
1P	21,5	1.610	0.016	
2P	70	1.609	0.046	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3P	54	1.500	0.029	
4P	18,5	1.391	0.013	
5P	15,5	1.396	0.039	
6P	65	1.413	0.101	Positivo na cPCR para *Leishmania infantum*
7P	22,5	1.424	0.098	
8P	11,4	1.303	0.011	
9P	18	1.593	0.031	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
10P	14,5	1.234	0.035	
11P	25	1.250	0.018	
12P	13,2	1.469	0.011	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
13P	52	1.238	0.027	
14P	2,6	0.565	0.137	
15P	28,5	1.425	0.039	
16P	5,1	1.148	0.013	
17P	13,8	1.233	0.025	
18P	12,5	1.623	0.031	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
19P	3,2	0.573	0.050	
20P	40	1.290	0.023	
21P	24,5	1.256	0.094	

22P	28,5	1.541	0.038	
23P	8,9	1.290	0.016	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
24P	1,2	0.781	0.088	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
25P	63	1.518	0.052	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26P	50,5	1.656	0.013	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
27P	31,5	1.658	0.021	
28P	36,5	1.521	0.021	
29P	12,2	1.891	0.027	
30P	2,3	0.605	0.152	
31P	0,5	0.176	0.044	
1I	52	1.300	0.046	
2I	71.5	1.375	0.053	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3I	91	1.504	0.058	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
4I	54	1.459	0.075	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5I	36	1.440	0.025	
6I	51,5	1.373	0.044	
7I	1,4	1.300	0.016	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8I	18	1.390	0.077	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
9I	3,8	1.119	0.014	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
10I	7,6	2.849	0.005	
11I	1,6	1.348	0.007	Positivo na qPCR para *T. cruzi*

12I	4	1.463	0.017	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
13I	4,2	1.596	0.016	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
14I	9,4	2.265	0.006	
15I	3,2	2.333	0.012	
16I	1,8	0.745	0.007	
17I	1,8	1.450	0.003	
18I	2,7	2.455	0.003	
19I	5,3	2.120	0.004	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
20I	15,1	4.794	0.008	
21I	1,5	1.111	0.010	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
22I	8,9	3.086	0.005	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
23I	2,3	5.111	0.009	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
24I	5,2	1.253	0.015	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
25I	1,5	1.080	0.006	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
27I	12,2	2.480	0.007	
28I	3,8	3.125	0.004	
29I	0,3	3.000	0.002	
30I	5,2	1.300	0.004	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
31I	15	5.085	0.008	
1M	28	1.217	0.016	
2M	151	1.533	0.135	
3M	19	1.214	0.014	

4M	94	1.528	0.048	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5M	80,5	1.412	0.100	
6M	81	1.486	0.050	
7M	71,5	1.571	0.043	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8M	43,5	1.475	0.026	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
9M	58	1.506	0.034	
10M	178,5	1.312	0.098	
11M	91,5	1.476	0.116	
12M	91	1.444	0.056	
13M	37	1.396	0.045	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
14M	70	1.591	0.041	
15M	168	1.514	0.100	
16M	130,5	1.517	0.095	
17M	197	1.655	0.103	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
18M	46	1.533	0.051	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
19M	59,5	1.352	0.040	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
20M	108,5	1.528	0.085	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
21M	92	1.449	0.061	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
1G	136,5	1.625	0.078	
2G	97	1.603	0.065	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3G	77,5	1.632	0.059	
4G	65	1.287	0.034	Positivo na qPCR para *T. cruzi*

5G	109	1.664	0.133	
6G	32	1.600	0.042	
7G	3,2	0.621	0.021	
8G	27	1.385	0.018	
9G	54	1.500	0.038	
10G	21.5	1.558	0.014	
11G	3,5	2.917	0.031	
12G	131	1.550	0.102	
13G	23	1.278	0.036	Reagente para *T. cruzi* à RIFI
14G	13,2	2.809	0.007	Reagente para *T. cruzi* à RIFI
15G	11,4	1.254	0.014	
16G	26	1.268	0.015	Reagente para *T. cruzi* à RIFI
17G	47,5	1.338	0.025	
18G	57	1.520	0.048	
19G	31	1.512	0.017	
20G	17	1.201	0.018	
21G	22,5	1.250	0.083	
22G	21	1.561	0.014	
23G	14	1.229	0.010	
24G	46	1.394	0.036	
25G	33,5	1.136	0.063	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26G	211	1.529	0.126	
27G	66	1.347	0.061	
28G	121,5	1.568	0.088	
29G	42,5	1.269	0.027	

30G	97	1.504	0.083	
1U	67,5	1.500	0.062	
2U	125	1.613	0.077	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
3U	78	1.608	0.055	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
4U	94,5	1.575	0.051	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
5U	69	1.551	0.059	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
6U	67	1.540	0.044	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
7U	78,5	1.586	0.063	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8U	40	1.311	0.024	
9U	12	2.880	0.007	
10U	7,7	1.719	0.032	
11U	8,7	1.880	0.008	
12U	10,1	1.961	0.022	
13U	9,7	1.708	0.008	
14U	8	1.231	0.009	
15U	2,5	0.962	0.011	
16U	3,5	1.408	0.009	
17U	4	0.899	0.011	
18U	3,7	0.987	0.013	
19U	2	0.684	0.008	
20U	3,3	0.985	0.012	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
21U	3,7	0.913	0.014	
22U	5,7	1.242	0.011	Positivo na qPCR para *T. cruzi*

24U	5,7	1.165	0.018	
25U	1,9	0.587	0.009	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
26U	8,2	1.691	0.007	
27U	7,3	1.587	0.006	
1S	0,6	0.244	0.004	
2S	1,8	0.854	0.013	
3S	14,1	1.979	0.008	
4S	6,2	2.255	0.008	
5S	5,8	1.250	0.007	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
6S	3,9	0.765	0.016	
7S	3,3	0.892	0.015	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
8S	10,2	1.293	0.009	
9S	4,4	1.048	0.026	
10S	4,6	1.296	0.009	
11S	6,1	1.402	0.028	
12S	6,5	1.548	0.017	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
13S	2,2	0.672	0.012	Positivo na qPCR para *T. cruzi*
14S	5	0.943	0.010	
15S	1,9	0.787	0.012	
16S	4,5	1.435	0.016	
17S	5	1.269	0.024	
19S	9,5	1.570	0.015	Positivo na qPCR para *T. cruzi*

10.20 Anexo XX

Tabela 10. Relação de 51 amostras de sangue de cães e gatos, procedentes de Unidades de Vigilância de Zoonoses de diferentes municípios do litoral do Estado de São Paulo, positivas à qPCR para *Trypanosoma cruzi*.

Amostra	Município	Espécie	Ct	Tm (ºC)
2P	Peruíbe	Cão	32,37	81
9P	Peruíbe	Cão	33	81,5
12P	Peruíbe	Cão	32,49	81,5
18P	Peruíbe	Cão	32,89	80,5
23P	Peruíbe	Gato	32,76	82,5
24P	Peruíbe	Gato	32,63	81,5
25P	Peruíbe	Gato	32,78	82,5
26P	Peruíbe	Gato	30,61	82,5
2G	Guarujá	Cão	32,82	81,5
4G	Guarujá	Cão	31,29	82
25G	Guarujá	Cão	32,85	84
4M	Mongaguá	Cão	32,72	84,5
7M	Mongaguá	Cão	31,88	81,5
8M	Mongaguá	Cão	32,96	81,5
13M	Mongaguá	Cão	30,98	81
17M	Mongaguá	Cão	31,47	84
18M	Mongaguá	Cão	31,78	81,5
19M	Mongaguá	Cão	32,64	82
20M	Mongaguá	Cão	32,43	81,5
21M	Mongaguá	Gato	32,35	81,5
2U	Ubatuba	Gato	31,48	81

3U	Ubatuba	Gato	32,96	81,5
4U	Ubatuba	Gato	30,75	84,5
5U	Ubatuba	Gato	31,96	81,5
6U	Ubatuba	Gato	30,07	84,5
7U	Ubatuba	Gato	32,07	84
20U	Ubatuba	Cão	31,88	84
22U	Ubatuba	Cão	32,03	84
25U	Ubatuba	Cão	32,96	81
5S	São Sebastião	Cão	31,04	84
7S	São Sebastião	Cão	32,08	83,5
12S	São Sebastião	Cão	30,56	83,5
13S	São Sebastião	Cão	31,77	83,5
19S	São Sebastião	Gato	31,03	83,5
2I	Itanhaém	Cão	32,6	82
3I	Itanhaém	Cão	30,44	82
4I	Itanhaém	Cão	32,56	82
7I	Itanhaém	Gato	30,44	83,5
8I	Itanhaém	Gato	29,81	83,5
9I	Itanhaém	Gato	31	83,5
11I	Itanhaém	Gato	32,85	86
12I	Itanhaém	Gato	31,72	81,5
13I	Itanhaém	Gato	32,31	87
19I	Itanhaém	Gato	31,19	84
21I	Itanhaém	Gato	32,35	82,5
22I	Itanhaém	Gato	30,83	82
23I	Itanhaém	Gato	32,27	84

24I	Itanhaém	Gato	31,42	84,5
25I	Itanhaém	Gato	32,18	86,5
26I	Itanhaém	Gato	31,54	83
30I	Itanhaém	Gato	31,38	85