

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO CLÍNICO DA INFECÇÃO NATURAL POR *T. CRUZI*
EM CÃES RESIDENTES EM UMA ÁREA RURAL DE MATO
GROSSO DO SUL, BRASIL**

**Alda Izabel de Souza
Médica Veterinária**

Jaboticabal – São Paulo - BRASIL
Novembro de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO CLÍNICO DA INFECÇÃO NATURAL POR *T. CRUZI*
EM CÃES RESIDENTES EM UMA ÁREA RURAL DE MATO
GROSSO DO SUL, BRASIL**

Alda Izabel de Souza

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

Jaboticabal – São Paulo - BRASIL

Novembro de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ALDA IZABEL DE SOUZA – Nascida em Ourinhos, aos 20 dias do mês de fevereiro de 1965, filha de José Delfino de Souza e Lutberg Rocha de Souza, formou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em fevereiro de 1988, obteve título de especialista em Morfofisiologia Básica pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em 1994 e de mestre pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro em setembro de 2001. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em março de 2004. Atua como docente nas áreas de Clínica Médica de Pequenos Animais e Patologia Clínica, na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP desde 1998.

“Um homem só tem o direito de olhar um
outro de cima para baixo, para ajudá-lo a
levantar-se”.

Gabriel Garcia Marquez

DEDICO

À minha família que foi essencial em mais uma caminhada: “Vocês são anjos que me deixam em pé quando minhas asas têm problemas em se lembrar como voar” (Silene B. Ayub).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter, novamente, permitido que eu encontrasse tantos amigos em mais uma etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho pela oportunidade, confiança, orientação, incentivo e compreensão.

Ao Dr. Maurício Pompilio pela primordial sugestão de trabalhar em Furnas dos Dionísios.

Aos meus amigos Fernando Arévalo Batista e Charles Ferreira Martins pelo encaminhamento e incentivo para iniciar o doutorado.

A todos os meus alunos da UNIDERP que me ajudaram no trabalho de campo.

Ao meu ex-aluno e amigo André Luis Galvão pelo apoio e ajuda na resolução de problemas burocráticos.

Aos *cardio-boys* e *cardio-girls*: Daniel Paulino Junior, Marlos Gonçalves de Sousa, Gláucia Bueno Pereira, João Paulo da Exaltação Pascon, Tatiana Champgnon pela acolhida e constante disposição para o trabalho em equipe.

À Sra. Clemilda Martins e todos os moradores de Furnas dos Dionísios, pela receptividade e colaboração no trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Rosangela Zacarias Machado e sua equipe por disponibilizar seu laboratório e materiais para realização dos testes de imunofluorescência.

À Dr^a. Eufrosina Umezawa e sua equipe pela realização das provas de ELISA e TESA-blot e sugestões durante a realização do trabalho.

À Dr^a. Marta Maria Teixeira pelas orientações e encaminhamento das amostras.

À Prof^a. Dr^a. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval por disponibilizar seu laboratório, equipe, materiais e perder várias noites nas valiosas sugestões do presente trabalho.

À Médica Veterinária Elisa Teruya Oshiro, e às técnicas **Geucira Cristaldo** e **Zélia Soares da Silva** pela ajuda no trabalhoso isolamento do *T. cruzi*.

À Prof^a. Cássia Leal Brito pelo incentivo e ajuda com o *T. cruzi*.

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico pela ajuda com a estatística.

À Dr^a. Raquel Soares Juliano pela amizade e sugestões durante a realização do trabalho.

À Prof^a Mary Marcondes pelas sugestões e ajuda nas correções.

A todos os cães envolvidos no trabalho, especialmente o Pug, a Suinca, o Gordo, a Baronesa, o Bob e o Feliz pela resignação e lealdade.

A UNIDERP pelas várias liberações das atividades durante essa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV – UNESP, Campus de Jabotical, por ter me acolhido como filha.

A todos, que por conta de falha ou esquecimento (espero que perdoáveis) não tiveram seus nomes citados nestes agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	
Introdução	1
Revisão de literatura.....	2
Objetivos gerais.....	7
Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO 2 - DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, COM MÉTODOS CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS, EM CÃES INFECTADOS NATURALMENTE PELO <i>T.</i> <i>CRUZI</i> EM ÁREA DE OCORRÊNCIA DE DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE JARAGUARI, MS, BRASIL	
Resumo	8
Introdução	10
Material e métodos	12
Local do estudo.....	12
População estudada.....	12
Avaliação sorológica.....	13
Reação de imunofluorescência indireta (RIF) para <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i>	14
Ensaio imunossorvente ligado à enzima para <i>T. cruzi</i> (EAE ELISA e TESA- ELISA).....	16
Immunoblotting com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota (TESA-blot).....	17

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania chagasi</i>	19
Ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) para <i>Leishmania chagasi</i>	20
Avaliação parasitológica.....	21
Xenodiagnóstico clássico.....	22
Punção aspirativa de linfonodo.....	22
Análise estatística.....	23
Resultados e discussão.....	26
Conclusões.....	38
 CAPÍTULO 3 - ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO NATURAL POR <i>T. CRUZI</i> EM CÃES DE MATO GROSSO DO SUL.	
Resumo	39
Introdução	40
Material e métodos	42
Animais utilizados.....	42
Critérios de seleção dos animais.....	42
Exames laboratoriais.....	43
Avaliação sorológica.....	43
Avaliação cardiovascular.....	44
Exames bioquímicos do soro sanguíneo.....	45
Análise Estatística.....	48
Resultados e discussão.....	49
Conclusões.....	61
 REFERÊNCIAS	 62
 APÊNDICE.....	 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados da sorologia para <i>T.cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i> em 75 cães da comunidade afro-descendente de Furnas dos Dionísios, Mato Grosso do Sul.....	27
Tabela 2- Valores de sensibilidade, especificidade e índice Kappa para as técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunossorvente ligado à enzima com extrato alcalino de formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> (EAE ELISA) e ensaio imunossorvente ligado à enzima com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> (TESA-ELISA), utilizadas na sorologia para <i>T.cruzi</i>	30
Tabela 3- Número de amostras positivas e títulos de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> na RIFI de soros de cães chagásicos e não chagásicos confirmados pelo TESA-blot.....	34
Tabela 4- Número de animais e resultados dos testes sorológicos convencionais usados para diagnóstico de doença de Chagas (EAE-ELISA, RIFI) e leishmaniose visceral canina (RIFI, ELISA).	36
Tabela 5- Resultado dos exames de xenodiagnóstico para <i>T. cruzi</i> e punção aspirativa de linfonodo para <i>Leishmania</i> sp., em cães residentes em área endêmica para doença de Chagas e Leishmaniose visceral, de acordo como os resultados no TESA-blot.....	37
Tabela 6- Valores médios e desvios-padrão obtidos da Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Pressão Arterial Média (PAM), obtida por meio do método oscilométrico, dos cães naturalmente infectados pelo <i>T. cruzi</i>	50
Tabela 7- Valores médios e desvios-padrão obtidos por meio de eletrocardiografia para Freqüência cardíaca, duração onda P, intervalo PR, complexo QRS, intervalo	

QT, amplitude das ondas P e R e ritmo dos cães infectados naturalmente pelo <i>T. cruzi</i>	52
Tabela 8- Valores médios e desvios-padrão obtidos por meio de ecocardiografia em modo M dos cães infectados naturalmente pelo <i>T. cruzi</i>	53
Tabela 9- Valores médios e desvios-padrão dos picos de velocidade das ondas E e A das válvulas mitral e aórtica obtidos por meio de ecodopplercardiografia dos cães infectados naturalmente pelo <i>T. cruzi</i>	54
Tabela 10- Atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK), porção MB da creatina quinase (CK-MB), uréia, creatinina, proteínas totais (PT), albumina, globulinas totais (GT) e relação: albumina/globulina obtidas (A/G) dos cães infectados naturalmente pelo <i>T. cruzi</i>	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Comunidade rural Furnas dos Dionísios.....	13
Figura 2- Fotomicrografia da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> na diluição de 1:40.....	15
Figura 3- Exemplos de resultados no TESA-blot usando antígenos de secreção excreção de formas tripomastigota da cepa Y do <i>T. cruzi</i> para a confirmação da infecção chagásica em cães.....	18
Figura 4- Fotomicrografia da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> na diluição de 1:40.....	20
Figura 5- Realização do xenodiagnóstico clássico.....	25
Figura 6- Pesquisa direta do parasito após coloração com corante hematológico.....	25
Figura 7- Representação gráfica do número de animais confirmados como chagásicos pela associação de dois testes sorológicos, segundo os critérios da WHO (2002) e do teste confirmatório para a infecção chagásica, TESA-blot.....	29
Figura 8- Distribuição dos níveis de anticorpos utilizando a prova de EAE ELISA nas amostras dos animais confirmados (chagásicos) e não confirmados (não chagásicos) como infectados pelo <i>T. cruzi</i> , por meio do TESA-blot.....	32
Figura 9- Distribuição dos níveis de anticorpos utilizando a prova de TESA-ELISA nas amostras dos animais confirmados (chagásicos) e não confirmados (não chagásicos) como infectados pelo <i>T. cruzi</i> , por meio do TESA-blot.....	33
Figura 10- Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal e latero-lateral, imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M, imagem	

doppler do fluxo da válvula mitral e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II do animal 1.....	57
Figura 11- Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal e latero-lateral, imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M, imagem doppler do fluxo da válvula mitral e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II do animal 2.....	58
Figura 12- Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal e latero-lateral, imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M, imagem doppler do fluxo da válvula mitral e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II do animal 3.....	59
Figura 13- Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal e latero-lateral, imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M, imagem doppler do fluxo da válvula mitral e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II do animal 4.....	60

ESTUDO CLÍNICO DA INFECÇÃO NATURAL POR *T. CRUZI* EM CÃES RESIDENTES EM UMA ÁREA RURAL DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

RESUMO - O trabalho teve como objetivo descrever as características clínicas da infecção natural pelo *T. cruzi* em cães residentes em uma área rural do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram utilizados métodos sorológicos convencionais e não convencionais em 75 cães residentes na área e avaliação cardiovascular e da bioquímica sérica em quatro animais confirmadamente chagásicos. Foram usados os testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA com antígenos da forma epimastigota do *T. cruzi* (EAE ELISA) e ELISA com antígeno excretado e secretado da forma tripomastigota do *T. cruzi* (TESA-ELISA), que detectaram anticorpos em 45,33% (n=34), 24,0% (n=18) e 12,0% (n=09) dos cães, respectivamente. A real prevalência da infecção foi confirmada como 10,7% (n=08) pela técnica de *immunoblotting* com antígeno secretado e excretado da forma tripomastigota do *T. cruzi* (TESA-blot). O teste com melhor índice de concordância (Kappa; 0,93), sensibilidade (100%) e especificidade (98,5%) foi o TESA-ELISA, que quando associado à RIFI igualou-se aos dados obtidos com o TESA-blot (10,7%). Três dos quatro animais chagásicos apresentaram aumento da silhueta cardíaca direta, aumento da duração de onda P e do complexo QRS. Um cão apresentou bloqueio de ramo direto e outro, bloqueio atrioventricular de primeiro grau e parada sinusal. Notou-se, também, espessamento de parede livre de ventrículo esquerdo em diástole, redução da fração de encurtamento e inversão dos picos de velocidade das onda E e A, indicando disfunção sistólica e diastólica. Na bioquímica sérica os animais apresentaram creatina quinase (221 a 404 U/L), fração MB da creatina quinase (189-304 U/L), proteínas totais (7,6-10,2g/dL) e globulinas totais (4,6 a 7,7g/dL) elevadas, e redução na relação albumina/globulina que sugeriram uma injúria miocárdica e estímulo antigênico persistente.

Palavras-chave: doença de Chagas, miocardite, TESA-blot, TESA-ELISA, *Trypanosoma cruzi*

CLINIC STUDY OF NATURAL INFECTION BY *TRYPANOSOMA CRUZI* IN DOGS RESIDING IN A RURAL AREA IN MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL

SUMMARY - This study was conducted to describe the clinical characteristics of the natural infection caused by the *T. cruzi* in dogs residing in a rural area of Mato Grosso do Sul, Brazil. Conventional and nonconventional diagnosis methods were used in 75 dogs living in this area for screening *T. cruzi* infection. Cardiovascular and biochemical serum were also performed in four confirmed positive dogs. The following tests were used: indirect immunofluorescence test (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay with *T. cruzi* epimastigote antigens (EAE ELISA) and enzyme-linked immunosorbent assay with *T. cruzi* excreted-secreted trypomastigote antigens (TESA-ELISA) with detected antibodies in 45,33% (n=34), 24,0% (n=18) and 12,0% (n=09) of the dogs, respectively. The real prevalence of the infection was confirmed as 10,7% (n=08) by immunoblotting test with *T. cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-blot). The test with the best concordance index (Kappa; 0,93), sensibility (100%) and specificity (98,5%) was the TESA-ELISA, which, when associated with IFAT had the same as results those obtained with the TESA-blot (10,7%). Three out of the four chagasic animals showed enlarged cardiac silhouette on x-ray and an increase of the P-wave duration and QRS complex in electrocardiogram. Two dogs presented conduction disturbances, right bundle block in one dog and the first-degree atrioventricular block and sinus arrest in another. The ecodopplercardiography showed an increase in thickness of the left ventricle wall during diastole, decrease of the shortening fraction and inversion in the speed peaks of the E and A waves, indicating the presence of systolic and diastolic disorders. All the four animals showed the enzymatic activities of creatine kinase (221-404 U/L), MB fraction of creatine kinase (189 a 304 U/L), total proteins (7,6-10,2g/dL) and total globulins (4,6-7,7g/dL) elevated and reduction of albumin/globulin relationship, suggested a myocardial injury and continuous antigenic stimulus.

Key words : Chagas' disease, myocarditis, TESA-blot , TESA-ELISA *Trypanosoma cruzi*

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma protozoonose, que afeta aproximadamente 16 milhões de pessoas no continente americano. É bem caracterizada, no homem, por uma miocardite aguda, seguida por uma longa fase assintomática que em alguns casos progride para uma fase debilitante e freqüentemente fatal com envolvimento grave do miocárdio, podendo chegar à insuficiência cardíaca.

Estudos com inoculação de cepas de *T. cruzi* em diferentes espécies animais têm confirmado que o cão é o melhor modelo experimental da doença, com capacidade de desenvolver, de maneira ímpar, alterações semelhantes às observadas em pacientes humanos. Porém, os poucos conhecimentos das manifestações da doença a partir de infecção natural nesses animais advém de dados de necropsia.

Devido à sua estreita relação com o homem, o cão é também identificado como o principal reservatório doméstico do agente e um importante sentinela da doença de Chagas em uma região, capaz de fazer a intersecção entre os ciclos doméstico e silvestre do parasito. SILVA (2002) afirma que o estudo sorológico nessa espécie pode ser uma alternativa para a vigilância da doença em humanos. Vale ressaltar, porém, que em áreas de sobreposição de doença de Chagas e leishmaniose essa informação pode ser distorcida quando se utilizam testes sorológicos convencionais.

Ao se considerar essas peculiaridades do cão e a escassez de informações sobre as características da infecção natural, admite-se a necessidade de investigar as reais variações clínicas e laboratoriais nessa espécie com o propósito de reduzir os erros de diagnóstico na clínica veterinária, assim como conhecer o padrão de resposta frente aos diferentes testes sorológicos utilizados em estudos epidemiológicos.

REVISÃO DE LITERATURA

O *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, é causador da doença de Chagas, afecção esta que representa um dos mais significantes problemas de saúde pública no continente Americano. Este parasito infecta o homem e vários animais em diversas regiões, inclusive no Brasil (SILVA, 1979; DIAS, 1987; TEIXEIRA et al., 2001; COURA et al., 2002; SOSA-JURADO et al., 2004; DIOSQUEZ et al., 2004; SANCHEZ-GUILLÉN et al., 2006) e sua transmissão é feita por insetos hematófagos da família Reduviidae que carregam a forma infectante, tripomastigota metacíclica, em seus fluidos fecais (WHO, 2002).

Animais e homens parasitados, triatomíneos e hospedeiros susceptíveis constituem a ampla rede de transmissão da parasitose (TEIXEIRA et al., 2001; SOSA-JURADO et al., 2004; REITHINGER et al., 2005).

As formas infectantes penetram facilmente por meio da mucosa ou qualquer solução de continuidade da pele. Não atravessam a pele íntegra, mas o local da picada pode servir de ponto de penetração (REY, 2001).

A infecção pela mucosa oral é descrita principalmente em animais, devido ao hábito de caçarem e matarem os insetos vetores e outros animais parasitados ou lamberem o ponto irritado pela picada. No caso do homem, essa forma de transmissão ocorre de maneira esporádica e circunstancial, por meio de alimentos contaminados com triatomíneos parasitados, ou suas dejeções (WHO, 2002; PINTO DIAS, 2006; ANDRADE et al., 2006). Admite-se que, no ciclo silvestre a transmissão oral é uma forma habitual e freqüente de circulação do parasito (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991).

A transmissão transplacentária foi descrita em humanos e em cães na fase crônica da doença (BARR et al., 1995; RASSI et al., 2004), e a transfusão sangüínea é considerada o segundo principal mecanismo de infecção humana, depois do vetorial, devido ao aumento da migração de indivíduos da zona rural para zona urbana onde não existem os triatomíneos (GUSMÁN-BRACHO et al., 1998; MONTEÓN-PADILHA et al., 1999).

No local onde ocorre a penetração, as formas tripomastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e transformam-se em amastigotas, multiplicam-se por divisão binária, readquirem a forma tripomastigota que, após lisar a célula hospedeira, ganham o espaço intersticial. Alguns flagelados invadem novas células e outros disseminam-se com a corrente circulatória sangüínea e linfática para diversos órgãos e tecidos (REY, 2001; TEIXEIRA et al., 2006).

As localizações preferenciais nos tecidos variam com a cepa de *T. cruzi*, algumas são predominantemente miotrópicas, colonizando preferencialmente fibras musculares esqueléticas e miocárdio, outras são reticulotrópicas apresentando-se em número considerável no interior de macrófagos do baço, fígado e medula óssea. Um terceiro grupo prefere os tecidos nervoso e reprodutivo (ARAÚJO-JORGE, 1989; DEVERA et al., 2003).

Uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, distribuídos nos mais diversos e variados nichos ecológicos, são descritos como susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*. Animais silvestres, principalmente os de hábitos sinantrópicos como os marsupiais (TEIXEIRA et al., 2001; DIOSQUEZ et al., 2004; HERRERA et al., 2005; YEO et al., 2005, LIMA et al., 2006), e roedores (HERRERA & URBANETA-MORALES, 1997; HERRERA et al., 2005; SANCHEZ-GUINLLÉN et al., 2006a), são considerados importantes reservatórios do parasito, e têm um papel importante na ligação entre os ciclos doméstico e silvestre da doença de Chagas.

Os cães têm sido envolvidos no ciclo de transmissão doméstica do *T. cruzi* em diferentes países, e estudos epidemiológicos demonstram a importância dessa espécie como fator de risco para a população humana, uma vez que esses animais apresentam uma capacidade muito maior para infectar triatomíneos (MONTENEGRO et al., 2002; SHADOMY et al., 2004; SOSA-JURADO et al., 2004; HERRERA et al., 2005; REITHINGER et al., 2005; CRISANTE et al., 2006).

O cão é indicado como a única espécie hospedeira capaz de desenvolver formas clínicas semelhantes às observadas em seres humanos (WILLIAMS et al., 1977; BARR et al., 1991). A fase aguda inicial é caracterizada por miocardite com focos de invasão dos miócitos cardíacos pelo parasito, que levam a distúrbios de

condução elétrica, podendo variar de uma forma assintomática a rapidamente fatal (BARR et al., 1992; ALVES, 2003).

Na fase crônica, os cães assim como os seres humanos, podem não apresentar sinais clínicos, embora a doença seja caracterizada por falência miocárdica e arritmias ventriculares (BARR et al., 1992, 1995). A falência cardíaca direita pode ocorrer primeiro e dominar as manifestações clínicas, seguida pela falência esquerda (FOX et al., 1986; MEURS et al., 1998).

As características clínicas da infecção chagásica natural em cães são pouco descritas e, embora essa espécie seja considerada uma vítima comum da doença, o maior conhecimento vem de infecções experimentais ou estudos *pós-mortem*, o que faz com que essa tripanosomíase seja raramente considerada no diagnóstico diferencial de causas de disfunção cardíaca na medicina veterinária (BARR et al., 1989; MONTENEGRO et al., 2002; CAMACHO & ALVES, 2007).

KITTLESON & KIENTLE (1998) e BRADLEY et al. (2000) sugerem que toda evidência de ritmos cardíacos anormais e insuficiência cardíaca congestiva, principalmente com disfunção ventricular direita, deve justificar a investigação de miocardite chagásica.

O diagnóstico laboratorial da doença na fase aguda pode ser feito com métodos que demonstram a presença do parasito no sangue, direta ou indiretamente (FERREIRA & ÁVILA, 1995; WHO, 2002). Na fase crônica, o cultivo do *T. cruzi* em meios artificiais e a técnica de xenodiagnóstico clássico ou artificial são considerados padrão ouro, porém, apresentam baixa sensibilidade mesmo após várias repetições (PINEDA et al., 1998; ARAÚJO et al., 2002; SHADOMY et al., 2004). Nessa fase, os métodos sorológicos constituem o alicerce do diagnóstico uma vez que os anticorpos são demonstráveis por longos períodos após a infecção (LAURICELLA et al., 1998a; UMEZAWA & SILVEIRA, 1999; FURUCHO, 2006).

Os testes convencionais de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) que utilizam extrato antigênico da forma epimastigota de *T. cruzi* são de baixo custo e de fácil realização para estudo

em grandes populações (WHO, 2002), porém, moléculas complexas do antígeno conferem baixa especificidade aos testes e favorecem o aparecimento de reações cruzadas com outras infecções, principalmente a leishmaniose (CHILLER et al., 1990; UMEZAWA & SILVEIRA, 1999; ARAÚJO et al., 2002; FRANK et al., 2003; ROSÁRIO et al., 2005).

Na busca de alternativas para reduzir reações falso-positivas várias preparações antigênicas têm sido testadas para o diagnóstico sorológico. Em seres humanos, o uso da associação de dois ou mais antígenos recombinantes ou preparações antigênicas contendo antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESAs) demonstrou excelente sensibilidade e especificidade no ELISA, com ausência de reações cruzadas com *Leishmania* sp (MALCHIODI et al., 1994; UMEZAWA & SILVEIRA, 1999; UMEZAWA et al., 2001; SILVA et al., 2004; FRADE, 2005; BERRIZBEITIA et al., 2006).

Associadas à variações nos antígenos, mudanças metodológicas são propostas como alternativas para melhorar a especificidade dos testes. O emprego do TESA na reação de *immunoblotting* (TESA-blot) mostrou 100% de sensibilidade e especificidade em pacientes com diagnóstico inconclusivo, infecção congênita ou nas fases aguda e crônica da doença (UMEZAWA et al., 1996b; SILVEIRA-LACERDA et al., 2004; SILVA et al., 2004, AMATO NETO et al. 2005). Essa prova tem como desvantagens o custo, a dificuldade de manipulação de formas tripomastigotas para obtenção do TESA e o fato de não ser, ainda, comercialmente viável (FURUCHO, 2006).

Outros métodos como PCR (Reação em cadeia de polimerase) e a citometria de fluxo, têm mostrado variados graus de eficiência na detecção de infecção chagásica crônica (BRADLEY et al., 2000; ARAÚJO et al., 2002; SHADOMY et al., 2004). Entretanto, não são satisfatórias para aplicação em inquéritos epidemiológicos, pois requerem laboratórios bem equipados, pessoal técnico altamente treinado, além de custo elevado.

As mesmas dificuldades relacionadas à especificidade dos testes observadas no diagnóstico da doença humana também foram relatadas em

estudos de populações caninas, embora nenhum deles tenha sido desenvolvido em área com sobreposição de doença de Chagas e leishmaniose (COSTA et al., 1991; BARR et al., 1991; LAURICELLA et al., 1998; MONTENEGRO et al., 2002; REYES et al., 2002; ROSÁRIO et al., 2005).

Estima-se que ainda existam entre 12 e 14 milhões de indivíduos infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob risco de transmissão em cerca de 18 países endêmicos (WHO, 2002).

No Mato Grosso do Sul investigações na população humana revelaram prevalências entre 0,05% e 3%, em diferentes municípios, com confirmação de casos autóctones. Em inquérito realizado na população animal, no período de 1975 a 1979, foram identificados reservatórios domésticos (3% de cães e 3,3% de gatos) e silvestres (3%), inclusive com xenodiagnósticos positivos (SILVA, 1979; SILVEIRA & VINHAES, 1998; POMPILO et al., 1998; AGUIAR & AGUIAR, 1999; BORGES-PEREIRA et al., 1999, 2001, POMPILO et al., 2005).

Atualmente o Brasil possui a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo vetor *Triatoma infestans*. É importante enfatizar, no entanto, que tal certificação não representa o controle efetivo da doença e que, no país, a diversidade de espécies de triatomíneos vetores, cujo hábitat preferido é o peridomicílio, associado à presença de cães, pode favorecer a infecção humana e necessita ser investigada (DIAS, 2002; WHO, 2002; FERREIRA & SILVA, 2006).

A área estudada no presente trabalho, denominada Furnas dos Dionísios, município de Jaraguari, Estado de Mato Grosso do Sul, está localizada em uma reserva biológica com 904 hectares, onde vivem aproximadamente 70 famílias, remanescentes quilombola. Esta comunidade rural foi escolhida pela possibilidade de avaliar a população total de cães e pelo fato da área apresentar características peculiares que favorecem a intersecção entre os ciclos silvestre, peridomiciliar e doméstico do *T. cruzi*.

OBJETIVOS GERAIS

Estudar as características clínicas da doença de Chagas em cães infectados naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a ocorrência da infecção pelo *T. cruzi* em cães da comunidade Furnas dos Dionísios em Mato Grosso do Sul.

Caracterizar a resposta à infecção por métodos sorológicos convencionais e não convencionais.

Caracterizar as alterações cardiovasculares e laboratoriais de cães com doença de Chagas infectados naturalmente.

CAPÍTULO 2- DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, COM MÉTODOS CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS, EM CÃES INFECTADOS NATURALMENTE PELO *T. CRUZI* EM ÁREA DE OCORRÊNCIA DE DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE VISCERAL NO MATO GROSSO DO SUL

RESUMO

A doença de Chagas é uma parasitose que afeta milhões de pessoas no Brasil e, assim como a leishmaniose visceral (LV), tem o cão como principal reservatório e sentinela da infecção. O trabalho teve como objetivos determinar a prevalência e caracterizar a reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi*, utilizando diferentes provas sorológicas, em cães residentes na comunidade Furnas dos Dionísios, localizada próxima à capital do Estado do Mato Grosso do Sul. Foram colhidas amostras de 100% dos cães (n=75) desse local para a utilização dos testes: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunossorvente ligado à enzima com extrato alcalino de formas epimastigota de *T. cruzi* (EAE ELISA) e ensaio imunossorvente ligado à enzima com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-ELISA). O *immunoblotting* com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-blot) foi usado como teste confirmatório da infecção chagásica. Foram realizados também, RIFI e ELISA para *Leishmania chagasi*, além de xenodiagnóstico para *T. cruzi* e punção aspirativa de linfonodo para *L. chagasi*. As técnicas de RIFI e EAE ELISA para *T. cruzi*, revelaram, respectivamente, 45,3% (n=34) e 24% (n=18) de positividade, sendo que dezessete animais (22,7%) apresentaram-se reagentes nas duas técnicas. Nove animais (12,0%) foram positivos no TESA-ELISA, oito cães (10,7%) na associação de RIFI e TESA-ELISA e oito (10,7%) no TESA-blot. O teste com maior índice de concordância (Kappa=0,93), sensibilidade (100%) e especificidade (98,5%), quando comparado ao teste confirmatório, foi o TESA-

ELISA. Na investigação para *L. chagasi*, 18,7% (n=14) e 16% (n=12) das amostras foram positivas no ELISA e RIFI, respectivamente. A alta especificidade do TESA-blot permitiu afirmar que a prevalência real da infecção pelo *T. cruzi* na área foi de 10,7%. A presença de reação cruzada entre *T. cruzi* e *L. chagasi* na RIFI e EAE ELISA na ausência de positividade no TESA-blot, indicou infecção pela *Leishmania*. A observação dos parasitos pelo xenodiagnóstico e punção aspirativa de linfonodo confirmaram, respectivamente, a infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* sp em cães da região. Os dados obtidos alertam para a dificuldade de diferenciação entre doença de Chagas e LVC com o uso de técnicas sorológicas convencionais e sugere o diagnóstico diferencial com o TESA-ELISA e TESA-blot para estudos epidemiológicos da doença de Chagas em cães de área onde há ocorrência simultânea dessas parasitoses.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, TESA-blot, TESA-ELISA, *Trypanosoma cruzi*

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma parasitose que afeta milhões de pessoas no Brasil. É causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário da família Trypanosomatidae (WHO, 2002). Os parasitos do gênero *Leishmania* também fazem parte dessa família e causam a leishmaniose visceral, cutânea, cutânea difusa e mucocutânea (GRIMALDI & TESH, 1993).

O diagnóstico dessas parasitoses durante a fase aguda da infecção, quando a parasitemia é mais alta, pode ser feito por observação direta do parasito em tecidos biológicos (fígado, baço e medula óssea) ou pelo xenodiagnóstico. Porém, esses métodos, embora considerados padrão-ouro, têm baixa sensibilidade, são muito laboriosos e pouco aplicáveis para investigações epidemiológicas (REY, 2001; CHIARY, 1999).

Devido a isso, os métodos sorológicos têm sido o alicerce do diagnóstico de ambas as doenças, principalmente porque os níveis de anticorpos são demonstráveis décadas após a infecção. Testes tradicionais como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), que usam a forma epimastigota do parasito como antígeno são importantes ferramentas, porém, as reações cruzadas em áreas onde *T. cruzi* e *Leishmania* sp se sobrepõem podem levar a diagnóstico falso positivo e distorções nas características epidemiológicas e no controle dessas doenças na região (CHILLER et al., 1990; BARBOZA et al., 1991; CHIARAMONTE et al., 1996).

Na tentativa de evitar esses problemas, diferentes antígenos têm sido testados no sorodiagnóstico da doença de Chagas (MALCHIODI et al., 1994; UMEZAWA et al., 1996; CHIARAMONTE et al., 1999), e o uso de uma proteína antigênica secretada e excretada da forma tripomastigota do *T. cruzi* (TESA) no teste de ELISA, tem demonstrado melhor especificidade que antígenos de formas epimastigota, embora reações cruzadas com infecção pela *Leishmania* sp também tenham sido observadas (UMEZAWA & SILVEIRA, 1999; NAKAZAWA et al., 2001; BERRIZBEITIA et al., 2006).

Uma estratégia para o aumento da especificidade na investigação da doença de Chagas e distinção da leishmaniose visceral, tem sido o emprego da reação de imunoblot com antígeno TESA (TESA-blot). O teste apresenta sensibilidade e especificidade de 100%, ausência de reação cruzada, possibilita a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção chagásica, e pode ser usado como confirmatório em resultados inconclusivos obtidos por sorologia convencional (UMEZAWA et al., 1996b; NAKAZAWA et al., 2001; SILVA et al., 2004; ZARATE-BLADES et al., 2007).

Tanto a doença de Chagas quanto a leishmaniose visceral constituem um sério problema de saúde pública em áreas endêmicas e epidêmicas onde coexistem. Ambas têm o cão como importante reservatório doméstico, fonte de infecção para os vetores, fator de risco para a infecção, além de constituírem um sentinela natural para o aparecimento de casos humanos (WHO, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O conhecimento da situação desse reservatório é essencial para a escolha de estratégias de controle que visem diminuir ou abolir os índices de infecção em humanos e animais em uma área, assim como, adotar medidas preventivas. Contudo, a confusão diagnóstica entre os agentes infecciosos pode comprometer o conhecimento da real situação epidemiológica do local e colocar em risco a saúde da população humana.

Os objetivos desse trabalho foram determinar a prevalência de cães chagásicos, caracterizar a reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi* nesses animais, utilizando provas sorológicas convencionais e não convencionais, e confirmar a endemicidade do *T. cruzi* e da *Leishmania* sp em uma área denominada Furnas dos Dionísio, localizada próximo à Capital do Estado do Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo

O estudo foi realizado na comunidade afro-descendente de Furnas dos Dionísios, constituída por uma área isolada de 904 hectares divididos em pequenas propriedades, distribuídas entre aproximadamente 70 famílias. A comunidade pertence ao município de Jaraguari e dista 35 Km da capital do Mato Grosso do Sul.

É caracterizada como região de planalto, com vegetação arbórea-densa, cortada por córregos e classificada como reserva biológica, com fauna e flora diversificadas. As casas são de construções simples, na maioria “barreadas” (madeira trançada, coberta de barro e palha) e de chão “batido” (CASTRO, 2000). As 82 residências da localidade não possuem infra-estrutura de saneamento básico, e o abastecimento de água é feito por minas e poços artesianos. Vários animais domésticos (cães, suínos, aves, bovinos e eqüinos) são criados próximo às moradias e animais sinantrópicos (tatus e gambás) visitam com frequência as casas (Figura 1).

População estudada

No inquérito sorológico foram examinados todos os cães (*Canis familiaris*) residentes na área rural de Furnas dos Dionísios, independente do sexo, raça ou idade, que totalizou 75 animais pertencentes a essa comunidade.

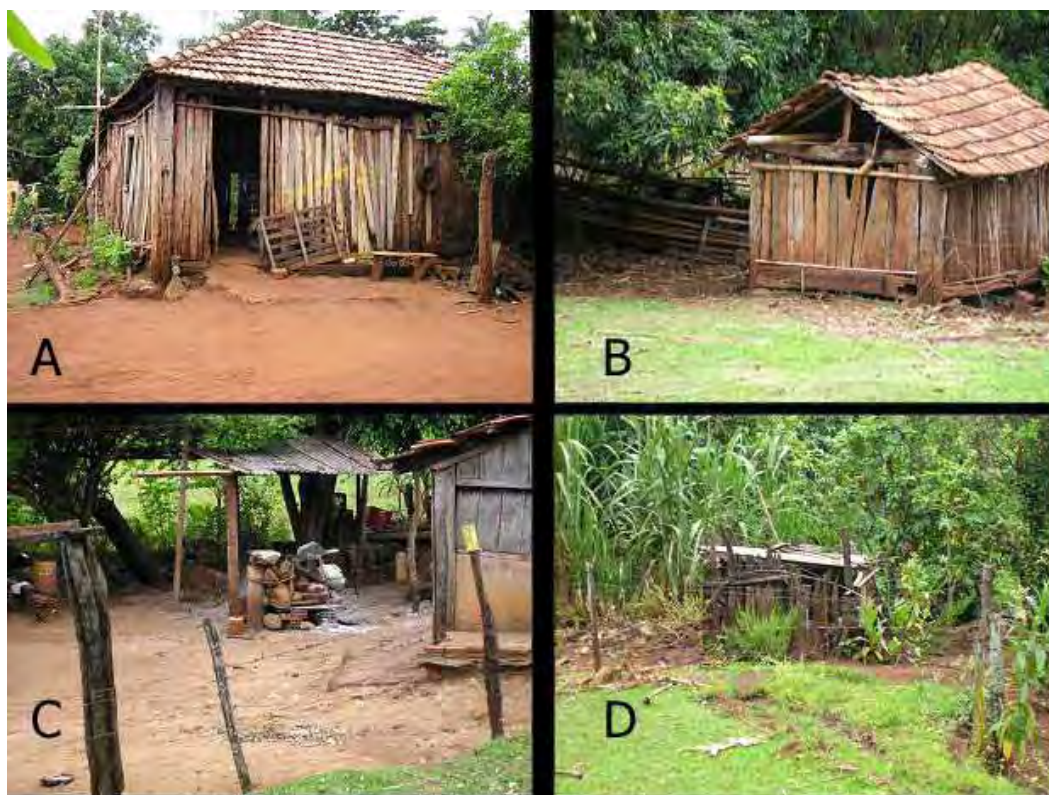


Figura 1. Comunidade rural Furnas dos Dionísios: nota-se condições das moradias (A e B) e abrigos peridomiciliares de animais domésticos com vista de densa vegetação arbórea próximo às residências (C e D) que favorece a presença de animais sinantrópicos.

Avaliação sorológica

Amostra de sangue de todos os cães foi obtida por punção da veia jugular e colocada em tubo estéril, sem anticoagulante. Após a centrifugação a 3.000 rpm durante 5 minutos e obtenção do soro, as amostras foram armazenadas em tubos plásticos do tipo Eppendorf® e acondicionadas a -20°C até o momento da realização das provas.

Anticorpos anti-*T. cruzi* foram detectados por meio dos testes de reação de imunofluorescência indireta, ensaio imunosorvente ligado a enzima (ELISA) com

extrato alcalino de formas epimastigota de *T. cruzi* (EAE ELISA) e antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-ELISA), além de *immunoblotting* com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-blot). O TESA-blot foi utilizado como teste confirmatório da infecção chagásica nos cães.

Tendo em vista que Mato Grosso do Sul é área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) e a possibilidade de reações cruzadas, os soros desses animais foram submetidos também, à sorologia para leishmaniose visceral pelos métodos de RIFI e ELISA.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Trypanosoma cruzi*

A RIFI para *Trypanosoma cruzi* foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia, do Departamento de Patologia Veterinária, da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, de acordo com CAMARGO (1966).

As lâminas foram sensibilizadas adicionando-se 10 µl da suspensão de formas epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em salina tamponada com fosfato (PBS) em cada círculo. Após a secagem em estufa, as lâminas foram armazenadas em freezer à -20°C. No momento do uso, as mesmas foram descongeladas em temperatura ambiente. Em cada círculo foram adicionados 10 µl da amostra dos soros a serem testados, bem como seus respectivos controles positivos e negativos, diluídos na concentração de 1:40 em PBS. As lâminas foram então incubadas durante 30 minutos em câmara úmida à 37° C e, posteriormente, lavadas três vezes em salina tamponada com fosfato (PBS). O anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína¹ foi diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg% e 10 µl desta solução foram adicionados em cada círculo das lâminas, que foram novamente

incubadas durante 30 minutos à 37° C. Após nova lavagem em tampão PBS, foi adicionado glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 9,5) e as lâminas foram recobertas por lamínula para leitura em microscópio de fluorescência.

Soros sabidamente positivos e negativos da soroteca do laboratório foram utilizados como controles positivos e negativos da reação. As amostras positivas na diluição de 1:40 foram tituladas. A titulação foi realizada diluindo-se cada soro a partir de 1:40, base 2, até a negatificação do mesmo. Após a leitura em microscópio equipado para fluorescência, foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluição $\geq 1:40$ (Figura 2).

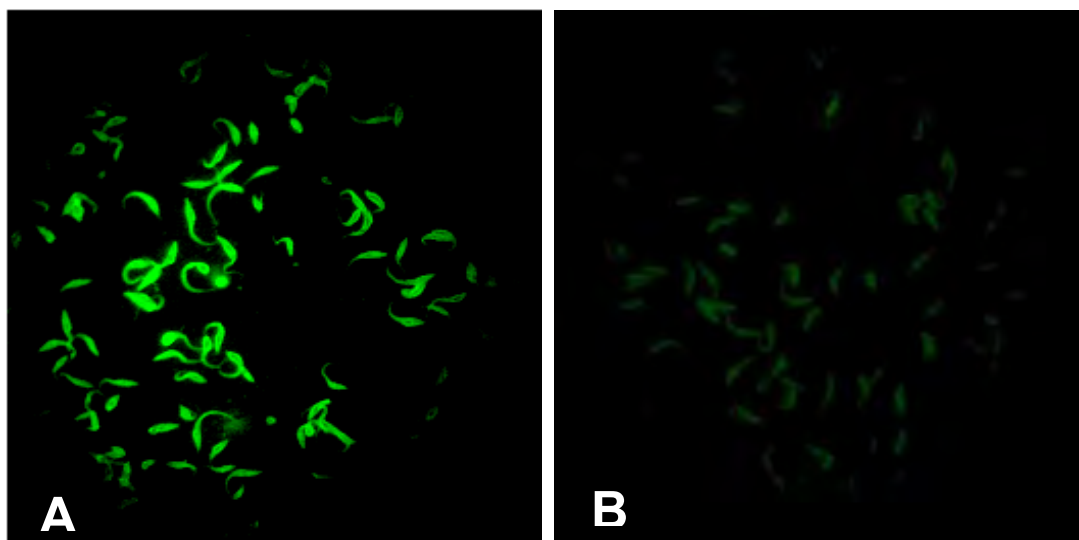


Figura 2. Fotomicrografia da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com formas epimastigota da cepa Y de *T. cruzi* na diluição de 1:40. Objetiva de 40x: (A) - exemplo de fluorescência positiva; (B) - exemplo de fluorescência negativa.

¹ Sigma- Aldrich Brasil Ltda.

Ensaio imunossorvente ligado à enzima para *T. cruzi* (EAE ELISA e TESA-ELISA)

As provas EAE ELISA e TESA-ELISA foram executadas com extrato alcalino de formas epimastigota e antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota (TESA) da cepa Y de *T. cruzi*, respectivamente. Ambas foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP, segundo UMEZAWA et al. (2001).

O antígeno TESA foi obtido segundo UMEZAWA et al. (1996): o sobrenadante de cultura de células LLC-MK₂ infectadas por cinco dias, foi centrifugado a 2,800g por 10 minutos a 4⁰ C, filtrado em membrana de acetato com porosidade de 0,22 µm e estocado a -70⁰ C até o momento do uso.

Foram utilizadas microplacas de fundo chato com 96 cavidades. Para o EAE ELISA as placas foram sensibilizadas com 50 µl de antígeno diluído a 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato por 18 horas a 4⁰ C em câmara úmida. Para o TESA-ELISA as placas foram sensibilizadas com 50 µl de antígeno diluído a 1:80 em tampão carbonato-bicarbonato por 18 horas a 4⁰C em câmara úmida. O bloqueio foi feito com 100 µl/cavidade de PBS Tween20 (PBST) a 0,05% e leite desnatado² 5% por 30 minutos à temperatura ambiente.

O soro dos cães foi diluído a 1:200 em PBST 0,05% e leite desnatado ² 1% e 50 µl/cavidade foi incubado por uma hora a 37⁰ C em câmara úmida. Anticorpos anti IgG-canino marcado com peroxidase³ foram diluídos a 1:3000 em PBS e incubados 50 µl/cavidade por uma hora a 37⁰ C em câmara úmida.

A revelação dos imune-complexos foi feita pela adição de 50 µl/cavidade de 5mg de orto-fenilenodiamina (OPD)³, adicionado a 12,5 ml de tampão citrato 0,05M pH 5,0⁴ e 7 µl de H₂O₂ a 30% e incubadas por 30 minutos na ausência de luz. A reação foi interrompida com adição de 25 µl/cavidade de HCl 4N.

² Molico®

³ Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA

A densidade óptica (DO) foi avaliada em 492nm⁴. O ponto de corte foi estipulado a partir da média acrescida de três desvios-padrão das DO das amostras de 35 animais negativos no TESA-blot.

No EAE ELISA foram consideradas positivas as reações com DO $\geq 0,21$ e no TESA-ELISA densidade óptica $\geq 0,25$.

Immunoblotting com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigotas (TESA-blot)

Esta prova foi realizada no Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP segundo UMEZAWA et al. (1996b).

O antígeno TESA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida⁵ a 7% e após sua separação transferido para uma membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 μm .

O soro dos cães foi diluído a 1:200 em PBST e leite desnatado a 1% e incubado por duas horas a temperatura ambiente. Os anticorpos foram detectados pela adição de anti-IgG canino marcado com peroxidase⁶ diluído a 1:2.000 em PBST e leite desnatado a 1% por duas horas à temperatura ambiente. Os imuno-complexos foram visualizados pela adição de 500 μl de uma solução reveladora (6mg de 4-cloro-naphthol, 2ml de metanol, 10ml de PBS e 10 μl de H₂O₂). A reação foi interrompida por adição de água destilada após o aparecimento das bandas. As membranas foram então lavadas em água destilada e secas entre dois papéis de filtro.

Foram adotados os seguintes critérios de leitura: IgG de chagásicos de fase crônica reagem positivamente com a banda de PM relativo de 150-160 kDa, IgG

⁴ Labsystems Multiskan MS

⁵ Mini-Protean II, BioRad

⁶ Sigma-Aldrich Brasil Ltda

de chagásico de fase aguda reagem com as bandas denominadas SAPA (6-7 bandas para cepa Y) de PM relativo que varia de 120-210 kDa (Figura 3). Outras bandas reativas não foram levadas em consideração.

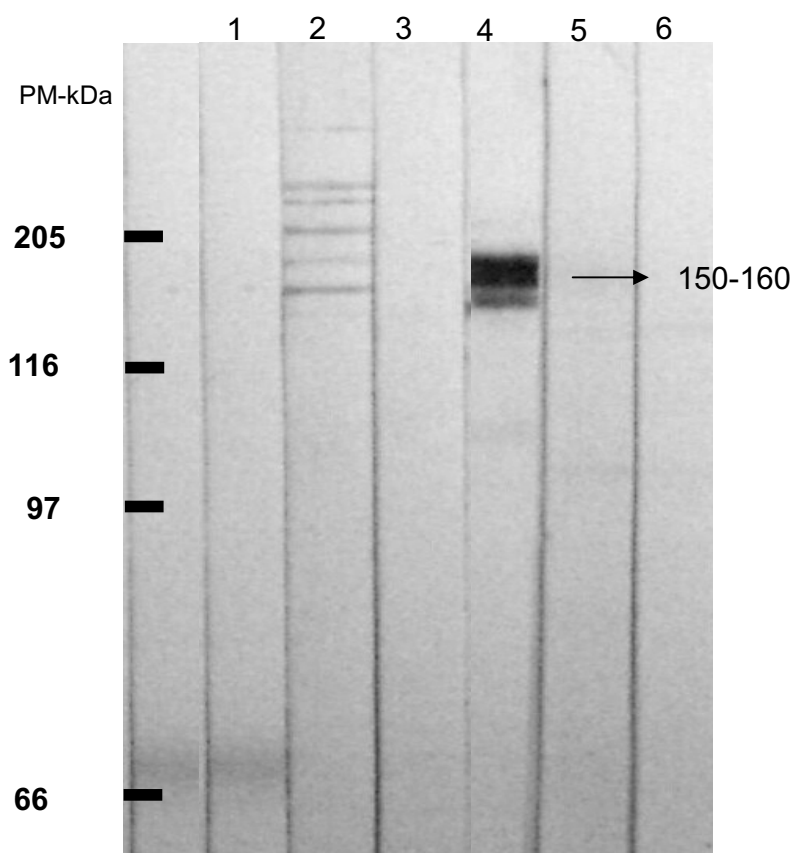


Figura 3. Exemplos de resultados no TESA-blot usando antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota da cepa Y do *T. cruzi* para a confirmação da infecção chagásica em cães. (1) - padrão de animal não chagásico; (2) - animal chagásico na fase aguda da infecção; (3, 5 e 6) - animais não chagásicos; (4) - animal com infecção na fase crônica, banda de peso molecular 150-160 kDa (seta).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania chagasi*

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Leishmania chagasi* foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia, do Departamento de Patologia, da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, de acordo com OLIVEIRA (2004).

As lâminas foram sensibilizadas adicionando-se em cada círculo, 10 µL da suspensão de promastigotas de *Leishmania chagasi* em PBS. Após a secagem em estufa, as lâminas foram armazenadas em freezer à -20°C. No momento do uso, as lâminas foram descongeladas em temperatura ambiente. Em cada círculo foram adicionados 10 µL da amostra dos soros a serem testados, diluídos na concentração de 1:40 em PBS. As lâminas foram então incubadas durante 30 minutos em câmara úmida à 37°C e, posteriormente, lavadas três vezes em PBS. O anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína foi diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg% e 10 µL desta solução foram adicionados em cada círculo das lâminas, e novamente incubadas durante 30 minutos à 37°C. Após nova lavagem em tampão PBS, foi adicionado glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 9,5) e as lâminas foram recobertas por lamínula para leitura em microscópio de fluorescência.

Soros sabidamente positivos e negativos, da soroteca do laboratório, foram utilizados como controles positivo e negativo da reação. As amostras positivas na diluição de 1:40 foram tituladas. A titulação foi realizada diluindo-se cada soro a partir de 1:40, base 2, até a negatificação do mesmo. Após a leitura em microscópio equipado para fluorescência, foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluição $\geq 1:40$ (Figura 4).

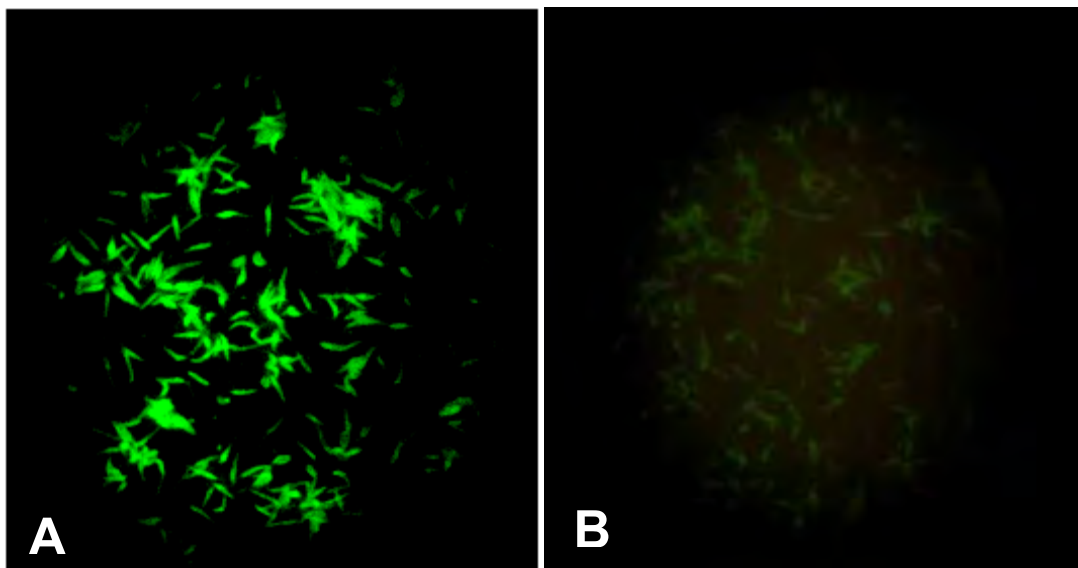


Figura 4. Fotomicrografia da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na diluição de 1:40. Objetiva de 40x: (A) - fluorescência positiva; (B) - fluorescência negativa.

Ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) para *Leishmania chagasi*

Esta prova foi realizada no Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP segundo UMEZAWA et al. (2001).

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi*, na concentração de 20µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS-Tween (PBST) por três vezes, as placas foram bloqueadas com 200 µl de BSF (soro fetal bovino) 10% em PBS e incubadas à temperatura ambiente, durante duas horas. Após nova lavagem com PBST por três vezes, 100 µl do soro controle positivo, do soro controle negativo e das amostras de soro dos animais, diluídas a 1:400 em PBS contendo 0,05% de Tween® 20 e 10% de BSF, foram adicionadas a cada poço e incubadas por três horas à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com PBST 20, adicionou-se

à placa 100 mL de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com peroxidase⁷, previamente titulado.

Após a incubação por uma hora em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada quatro vezes com PBST 20 e foram adicionados 100 mL de uma solução contendo 0,4 mg/mL do substrato OPD em diluente apropriado. A reação foi interrompida adicionando-se, a cada poço, 50 µl de H₂SO₄ 1M e, a densidade óptica (DO) foi avaliada a 492nm, utilizando-se leitor de ELISA⁴. O ponto de corte foi determinado a partir da média acrescida de três desvios-padrão, da leitura da densidade óptica do soro de animais sabidamente negativos. Foram consideradas positivas as reações com DO ≥ 0,27.

Avaliação parasitológica

Para confirmar a presença dos tripanosomatídeos na área estudada, 6 animais foram submetidos ao xenodiagnóstico clássico para pesquisa de *T. cruzi* e 10 animais foram submetidos ao exame de punção aspirativa de linfonodo para pesquisa de *Leishmania* sp.

Dos seis animais escolhidos para a realização do xenodiagnóstico clássico, quatro apresentavam os testes sorológicos de RIFI, EAE ELISA, TESA-ELISA e TESA-blot positivos para *T. cruzi*, e os testes sorológicos para leishmania visceral canina (RIFI e ELISA) negativos. Dois animais apresentavam testes convencionais (RIFI, EAE ELISA) positivos para *T. cruzi*, mas sem confirmação pelo TESA-blot e sorologia negativa para leishmania visceral canina (RIFI e ELISA).

Além dos seis animais relacionados no parágrafo anterior, mais quatro cães sem confirmação da infecção chagásica pelo TESA-blot, porém, com RIFI e ELISA convencionais positivos para doença de Chagas e LVC foram selecionados para o exame parasitológico para *Leishmania* sp.

⁷ Sigma Chemical, Sto Louis, Mo, USA

Devido à falta de triatomíneos suficiente para o xenodiagnóstico, associado às dificuldades inerentes a área estudada, a baixa sensibilidade dos testes parasitológicos e os objetivos do trabalho, a avaliação parasitológica não foi realizada em todos os animais.

Xenodiagnóstico clássico

O exame foi realizado ambulatorialmente, sem a necessidade de sedação dos animais, segundo REY (2001): ninfas de *Triatoma infestans* e *Triatoma sortida*, foram colocadas para se alimentar, por aproximadamente 30 minutos, na região da orelha de cada animal, após tricotomia. Em seguida os triatomíneos ingurgitados foram encaminhados ao Laboratório de Parasitologia Humana, do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - MS. Após 30 dias, os insetos foram examinados a partir da compressão do abdômen e avaliação direta de todo o conteúdo fecal, homogeneizado com solução salina, em microscópio óptico (Figura 5). O protozoário foi identificado por meio de sua movimentação ativa. Posteriormente o material foi corado com corante hematológico para melhor visualização das formas do parasito (Figura 6A).

Punção aspirativa de linfonodo

A punção aspirativa foi realizada nos linfonodos poplíteos, segundo COWELL & TYLER (1989) utilizando agulha hipodérmica 25X7 acoplada a uma seringa de 10 mL. Lâminas confeccionadas a partir do material colhido foram coradas com corante hematológico⁸ e observadas ao microscópio óptico em objetiva de 100x para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp (Figura 6B).

Análise estatística

Foram determinadas a sensibilidade e especificidade dos métodos de RIFI, EAE ELISA e TESA-ELISA para *T. cruzi* utilizando-se como referência os resultados obtidos no TESA-blot.

Os cálculos seguiram as fórmulas apresentadas abaixo:

$$\text{Sensibilidade: } \frac{\text{positivos verdadeiros}}{(\text{positivos verdadeiros} + \text{falso negativos})} \times 100$$

$$\text{Especificidade: } \frac{\text{negativos verdadeiros}}{(\text{negativos verdadeiros} + \text{falso positivos})} \times 100$$

Para avaliar o grau de concordância dos métodos de RIFI, EAE ELISA e TESA-ELISA com o teste confirmatório TESA-blot, utilizou-se o índice Kappa. A interpretação da concordância seguiu os valores propostos por DAWSON (2003) e encontram-se apresentados abaixo.

$K \leq 0,2$	Ausência de concordância
0,01-0,2	Pequena concordância
0,21-0,4	Discreta concordância
0,41-0,6	Regular Concordância
0,61-0,8	Boa concordância
0,81-0,92	Muito boa concordância
0,93-1,0	Excelente concordância

A comparação entre os grupos de animais chagásicos e não chagásicos foi analisado pelo teste de Mann Whitney e a correlação dos

⁸ Panótico rápido® - Laborclin

resultados positivos entre os testes de EAE ELISA e TESA ELISA foi analisada pelo coeficiente de Pearson (r).

As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para as análises estatísticas e a preparação dos gráficos foram utilizados os software BioEstat versão 3.0 e Graphpad Prism 5 for Windows.

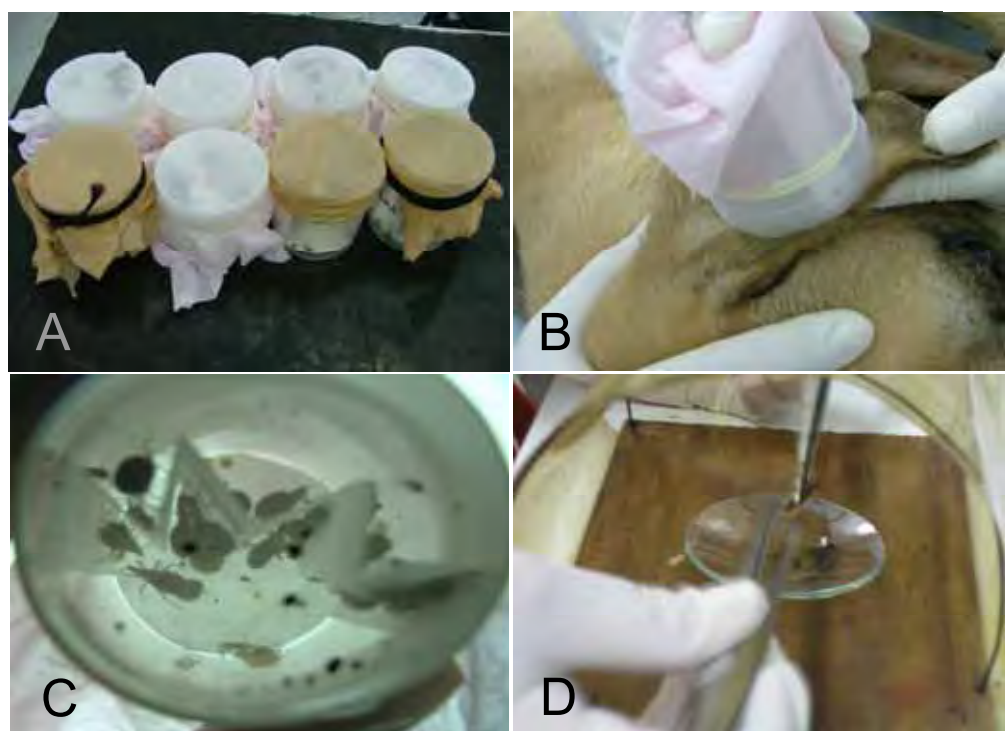


Figura 5. Realização do xenodiagnóstico clássico: (A) - frascos contendo ninfas de *Triatoma infestans* e *Triatoma sordida*; (B) - repasto dos triatomíneos durante 30 minutos em área tricotomizada; (C) - triatomíneos ingurgitados após o repasto; (D) - extração de conteúdo fecal para pesquisa direta do parasito.

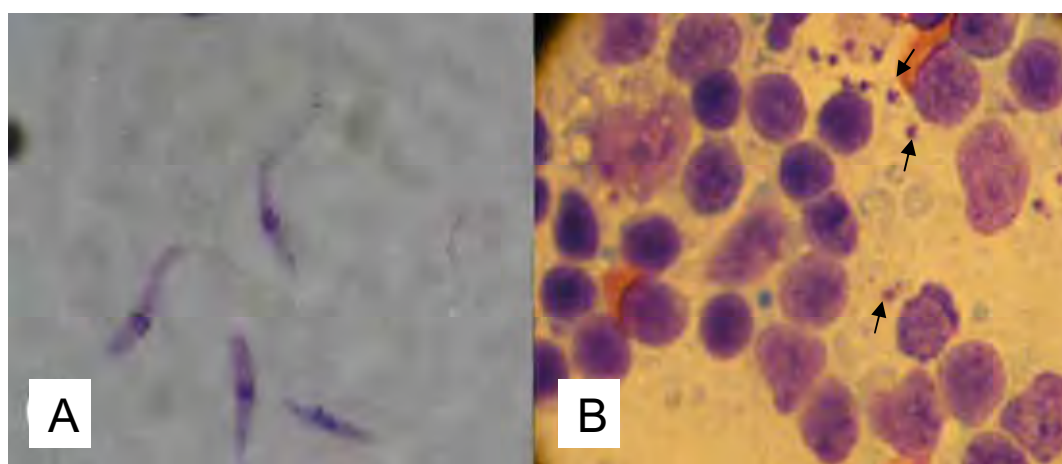


Figura 6. Pesquisa direta do parasito após coloração com corante hematológico: (A) - *T. cruzi* em fezes de triatomíneo. (B) - Formas amastigotas de *Leishmania* sp (setas). Coloração Panótico rápido®). Aumento de 100x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cão é considerado importante hospedeiro do *T. cruzi* e caracterizado como o principal reservatório doméstico em vários países. O conhecimento sobre o “status” de infecção nessa espécie permite inferir sobre a situação da doença na população humana, uma vez que esse animal pode atuar como fonte de transmissão do parasito no ambiente, assim como sentinela de vetores infectados com potencial para se alimentar em humanos (SHADOMY et al., 2004). No presente estudo, altos índices de positividade foram identificados tanto quando se analisa a prevalência individual, como quando se utiliza a associação de dois testes, como pode ser observado na tabela 1.

Dos 75 cães estudados, 57 eram machos e 18 fêmeas, todos sem raça definida. Na investigação para a infecção pelo *T. cruzi*, 45,33% (n=34) foram reagentes pela RIFI; 24,0% (n=18) pelo EAE ELISA, e 12,0% (n=9) pelo TESA-ELISA.

Todas as amostras foram testadas pelo TESA-blot para confirmação dos resultados, pois o antígeno TESA, aplicado sob a forma de imunoblot (TESA-blot), é indicado como teste confirmatório para resultados inconclusivos de infecção por *T. cruzi* obtidos por sorologia convencional e demonstra 100% de sensibilidade e especificidade (SILVA et al., 2004; AMATO NETO et al., 2005; UMEZAWA & SILVEIRA 1999). Dessas amostras, sete (9,30%) apresentaram bandas reativas entre 150-160 KDa indicando fase crônica da doença e uma (1,33%) com bandas entre 120 e 210 KDa, indicando fase aguda, totalizando 10,7% (n=8) de animais positivos (Tabela 1).

O índice de infecção de 10,7% confirmados pelo TESA-blot, representa a real prevalência da infecção chagásica na área, e é muito superior ao índice de 3,0% encontrados por SILVA (1979) em outra região do estado e assemelham-se aos índices observados na Argentina e Costa Rica (LAURICELLA et al., 1998; REYES, et al., 2002; DIOSQUEZ et al., 2004).

Quando comparados ao teste confirmatório (TESA-blot), a sensibilidade para os testes de RIFI e TESA-ELISA foi de 100% e para o EAE ELISA de 87,5%. A melhor especificidade foi obtida com o TESA-ELISA (98,5%) seguida pelo EAE ELISA (83,6%) e RIFI (61,2%) (Tabela 2).

O índice Kappa mostrou maior concordância entre o TESA-blot e o TESA-ELISA (Kappa=0,93). O teste EAE ELISA apresentou índice de concordância regular (Kappa=0,46), e a RIFI índice de concordância discreta (Kappa=0,25), quando comparados ao TESA-blot (Tabela 2).

Tabela 1. Resultados da sorologia para *T. cruzi* e *Leishmania chagasi* em 75 cães da comunidade afro-descendente de Furnas dos Dionísios, Mato Grosso do Sul.

teste	positivo		negativo	
	n	%	n	%
RIFI <i>T. cruzi</i>	34	45,33	41	54,67
EAE ELISA <i>T. cruzi</i>	18	24,00	57	76,00
TESA-ELISA <i>T. cruzi</i>	9	12,00	66	88,00
TESA-blot <i>T. cruzi</i>	8	10,67	67	89,33
RIFI <i>T. cruzi</i> + EAE ELISA <i>T. cruzi</i>	17	22,67	58	77,33
RIFI <i>T. cruzi</i> + TESA-ELISA	8	10,67	67	89,33
RIFI <i>Leishmania</i>	12	16,00	63	84,00
ELISA <i>Leishmania</i>	14	18,67	61	81,33

Esses resultados corroboram as observações de SILVA et al. (2004) e BERRIZBEITIA et al. (2006) de que o ELISA realizado com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-ELISA), embora possa apresentar reações falso positivas, tem melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção chagásica. Essa afirmação justifica a diferença encontrada no presente estudo, quando o número de amostras positivas no EAE ELISA é comparado aos índices de prevalência observados no TESA-ELISA (Tabela 1).

Na infecção humana, o diagnóstico da doença de Chagas é confirmado a partir da detecção de anticorpos por dois diferentes métodos sorológicos (WHO, 2002). Nos cães a determinação do diagnóstico e ou estudo de prevalência apresenta as mesmas características, com o diferencial de que, como o cão tem alta susceptibilidade à infecção pela *Leishmania chagasi*, em áreas onde ambas as doenças são endêmicas, a confirmação da infecção pelo *T. cruzi* pode ser superestimada, devido à presença de reação cruzada (COSTA et al., 1991; ROSÁRIO et al., 2005).

A utilização desse critério, no presente estudo, verificou que com a associação entre a RIFI e EAE ELISA, 22,7% (n=17) dos animais podiam ser considerados positivos. Já quando a associação entre os resultados positivos da RIFI e do TESA-ELISA foi utilizada para a confirmação da infecção, 10,7% (n=8) dos animais foram considerados positivos, se igualando aos valores obtidos aos resultados do TESA-blot (Tabela 1, Figura 7).

Chama a atenção o fato de que, o número de animais infectados diagnosticados pela associação de resultados obtidos na RIFI e EAE ELISA (22,7%) foi superior ao identificado pela associação RIFI e TESA-ELISA (10,7%), e corroboram os dados de inquéritos realizados em humanos e animais, que afirmam que o uso de antígenos da forma epimastigota promovem reações falso-positivas e podem levar à distorções sobre a situação da doença (CHILLER et al., 1990; UMEZAWA et al., 1996; FRANK et al., 2003; ROSÁRIO et al., 2005).

A confirmação do número de animais positivos identificados pelo TESA-blot e os baixos índices de concordância e especificidade da RIFI e EAE ELISA indicam que a associação desses dois testes convencionais, como confirmatório da infecção pelo *T. cruzi*, superestimou a prevalência da doença na região.

Entretanto, os números obtidos pela associação RIFI e TESA-ELISA, foram semelhantes aos observados pelo teste confirmatório (TESA-blot) e reafirmam o melhor índice de concordância, sensibilidade e especificidade do ELISA quando a forma tripomastigota é usada, corroborando com outras observações (KESPER et al., 2000; NAKAZAWA et al., 2001; UMEZAWA et al., 2001; BERRIZBEITIA et al., 2006).

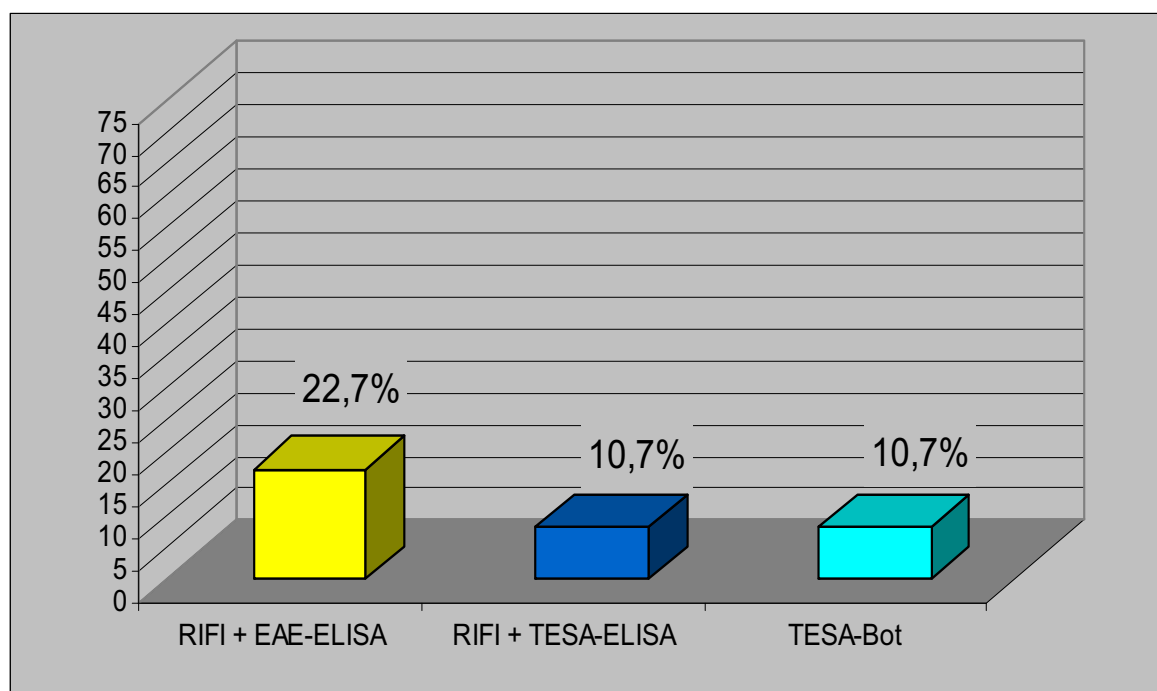


Figura 7. Representação gráfica do número de animais confirmados como chagásicos pela associação de dois testes sorológicos, segundo os critérios da WHO (2002) e do teste confirmatório para a infecção chagásica, TESA-blot.

Em áreas endêmicas, onde a prevalência da doença de Chagas é alta, a escolha dos testes de investigação deve fundamentar-se na elevada sensibilidade

e especificidade, que favorecem a identificação dos reservatórios, além da facilidade de execução e baixos custos das provas (ZANETTE, 2006). Neste contexto, tanto a associação da RIFI ao TESA-ELISA, quanto o uso individual do TESA-ELISA mostraram-se eficientes.

Tabela 2. Valores de sensibilidade, especificidade e índice Kappa para as técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunossorvente ligado à enzima com extrato alcalino de formas epimastigota de *T. cruzi* (EAE ELISA) e ensaio imunossorvente ligado à enzima com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-ELISA), utilizadas na sorologia para *T. cruzi*.

	Sensibilidade	Especificidade	Índice Kappa
RIFI	100%	61,2%	0,25
EAE ELISA	87,5%	83,6%	0,46
TESA-ELISA	100%	98,5%	0,93

Na avaliação do comportamento individual dos testes utilizados, verificou-se que, dos animais confirmados como chagásicos pelo TESA-blot (n=8), todos apresentaram reação positiva na RIFI com títulos que variaram de 1:80 a 1:2560 (Tabela 3). O título mais baixo (1:80) coincidiu com a amostra do animal que apresentou bandas entre 120-210 KDa no TESA-blot, indicativas de fase aguda da doença de Chagas. Das 67 amostras não confirmadas como positivas pelo TESA-blot, 26 (38,8%) apresentaram título na RIFI que variaram de 1:40 a 1:1280 (Tabela 3), sendo observado uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos confirmados e não confirmados pelo TESA-blot ($p < 0,001$).

Tal resultado sugere que em animais chagásicos os títulos de anticorpos tendem a ser mais elevados na RIFI. ALVES (2003), realizando inoculação experimental de *T. cruzi* em cães, observou resposta imune humoral a partir da segunda semana da infecção e elevação dos títulos com a progressão do quadro,

o que caracterizou a presença de títulos altos na fase crônica e títulos baixos na fase aguda da doença.

É relevante destacar, porém, que em infecções naturais pelo *T. cruzi* a diferença na reatividade dos anticorpos podem estar na dependência de fatores genéticos e nutricionais do hospedeiro, do tipo de cepa e volume do inóculo, da possibilidade de reinfecções, da ocorrência de outros agentes na área, assim como da baixa especificidade (61,2%) da RIFI (GÜRTLER et al., 1991; UMEZAWA et al., 1996; MACHADO, et al., 2001).

Na observação dos resultados obtidos pelo EAE ELISA (Figura 8), verificou-se que no grupo das oito amostras confirmadas pelo TESA-blot, sete apresentaram DO acima do limiar de reatividade ($DO = 1,04 \pm 0,15$) e uma, identificada como do animal chagásico na fase aguda da infecção, apresentou DO abaixo do limiar de reatividade ($DO = 0,12$). Dos 67 soros não confirmados pelo TESA-blot, 11 (16,7%) apresentaram DO acima do ponto de corte ($DO = 0,50 \pm 0,09$). A análise estatística identificou uma diferença significativa entre os resultados dos animais chagásicos e não chagásicos nesse teste ($p < 0,0001$).

A distribuição dos valores da DO obtidos pelo TESA-ELISA pode ser visualizada na figura 9. Verifica-se que no grupo de animais confirmados pelo TESA-blot (chagásicos), todas as amostras tiveram os valores da DO acima do limiar de reatividade ($DO = 0,80 \pm 0,12$), com diferença estatística significativa entre os resultados do grupo chagásico e não chagásico ($p < 0,001$).

A resposta imunológica frente à infecção pelo *T. cruzi* inicia-se após a invasão de células do sistema fagocítico mononuclear pelo parasito, desencadeando inicialmente uma resposta imune celular. A formação de anticorpos específicos do tipo IgM e IgG começa já na fase aguda da doença e nesse período sua detecção, para a realização de diagnóstico, pode ser prejudicada se o teste se basear na utilização de antígenos da forma epimastigota do parasito (MATSUMOTO et al., 1993).

A observação da distribuição da DO com o uso do EAE ELISA e TESA-ELISA na área endêmica estudada, corroboram a sensibilidade desses testes

Tabela 3. Número de amostras positivas e títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* na RIFI de soros de cães chagásicos e não chagásicos confirmados pelo TESA-blot.

	n	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	NR	positivo
Chagásicos	08	00(0%)	01(12,5%)	01(12,5%)	00(0%)	04(50,0%)	01(12,5%)	01(12,5%)	0(0,0%)	08 (100%)
Não chagásicos	67	08(11,9%)	08(11,9%)	02(2,9%)	05(7,5%)	02(3,0%)	01(1,5%)	00(0,0%)	41(61,1%)	26(38,8%)
TOTAL	75	09(12,0%)	09(12,0%)	03(4,0%)	05(6,7%)	06(8,0%)	02(2,7%)	01(1,33%)	41(54,7%)	34(45,3%)

NR= Não reagente

Embora nenhum dos cães examinados apresentasse sinais clínicos compatíveis com LVC, 18,70% (n=14) das amostras foram positivas pelo ELISA ($DO \geq 0,27$) com antígenos de *Leishmania chagasi* e 16% (n=12) apresentaram títulos maior ou igual a 1:40 na RIFI com antígenos de *Leishmania chagasi* e indicaram infecção, segundo os critérios adotados pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006).

Chama atenção o fato que 83,33% (n=10) e 100 % (n=14) dos animais positivos na RIFI e ELISA para *L. chagasi*, respectivamente, apresentaram co-reatividade para *T. cruzi* nos testes de RIFI e ou EAE ELISA (Tabela 4). É freqüente o aparecimento de reações cruzadas entre *T. cruzi* e *Leishmania* sp em áreas de sobreposição desses parasitos com o uso de técnicas convencionais. O diagnóstico deveria se basear na identificação do parasito, porém, as técnicas parasitológicas apresentam baixa sensibilidade, principalmente na fase crônica das infecções, além das dificuldades de aplicação como métodos de triagem (CHIARI, 1999).

A co-reatividade observada no presente estudo entre os testes de RIFI e EAE ELISA para *T. cruzi* e *Leishmania chagasi*, assemelham-se às observações de ZANETTE (2006) e corroboram as afirmações de COSTA et al. (1991) e MALCHIODI et al. (1994) de que não é possível confirmar a infecção chagásica com métodos sorológicos convencionais uma vez que, pacientes com leishmaniose, não infectados pelo *T. cruzi*, podem ser positivos nesses testes.

A confirmação, pelo TESA-blot, da infecção pelo *T. cruzi* em oito animais sem sinais clínicos de LVC, mesmo na presença de reações sorológicas positivas para *L. chagasi*, sugere a ocorrência de reação cruzada entre os parasitos. Já a confirmação da LVC pode ser sugerida tendo em vista a ausência de positividade no TESA-blot, e a detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* nos testes RIFI e ELISA.

É importante sinalizar que resultados sorológicos positivos devem ser interpretados criteriosamente quando os testes convencionais são as únicas opções de diagnóstico, uma vez que além da reação cruzada entre *Leishmania* sp

e *T. cruzi*, outros agentes como *Babesia* sp, *Toxoplasma* sp e *Ehrlichia* sp, podem mascarar o diagnóstico em área de sobreposição dessas parasitoses (ZANETTE, 2006).

Tabela 4. Número de animais e resultados dos testes sorológicos convencionais usados para diagnóstico de doença de Chagas (EAE-ELISA, RIFI) e leishmaniose visceral canina (RIFI, ELISA).

n	Testes sorológicos			
	Doença de Chagas		Leishmaniose visceral canina	
	RIFI	EAE-ELISA	RIFI	ELISA
10	10	10	10	9
07	7	7	0	4
17	17	0	0	1
01	0	1	1	0
01	0	0	1	0
39	0	0	0	0
75	34 (45,33%)	18 (24,00%)	12 (16,00%)	14(18,67%)

Na avaliação parasitológica dos quatro animais que apresentaram os testes sorológicos positivos para *T. cruzi* na RIFI, ELISA e TESA-blot e negativo para *Leishmania* sp na RIFI, dois foram positivos no xenodiagnóstico para *T. cruzi* e nenhum apresentou positividade para *Leishmania* sp. Já no grupo de cães com testes sorológicos convencionais (RIFI e ELISA) positivos para *T. cruzi* e RIFI positivo para *L. chagasi*, mas com TESA-blot negativo, três foram parasitologicamente positivos para *Leishmania* sp (Tabela 5). Sendo assim, confirmou-se existência dos dois agentes na área.

A identificação dos dois protozoários associada aos resultados do inquérito sorológico confirma a endemicidade de *T. cruzi* e *L. chagasi* nessa área e alerta que a adoção dos critérios da WHO (2002) para confirmar a infecção chagásica,

utilizando técnicas sorológicas convencionais em estudos de população canina em áreas de sobreposição desses parasitos, pode comprometer a diferenciação e as medidas de controle das respectivas doenças.

Tabela 5. Resultados dos exames de xenodiagnóstico para *T. cruzi* e punção aspirativa de linfonodo para *Leishmania* sp, em cães residentes em área endêmica para doença de Chagas e Leishmaniose visceral, de acordo como os resultados no TESA-blot.

Resultados no TESA-blot	Xenodiagnóstico	Punção Aspirativa	Total
TESA-blot positivo	2/4	0/4	2/4
TESA-blot negativo	0/2	3/6	3/6

Uma estratégia a ser considerada em estudos epidemiológicos nessas áreas poderia ser a triagem inicial com o TESA-ELISA seguido pela confirmação com o TESA-blot, facilitando o diagnóstico diferencial.

Assim, devido ao potencial risco de saúde pública determinado por esses resultados e considerando que os cães domésticos servem como sentinelas para a presença de *T. cruzi* e *L. chagasi*, e que a doença de Chagas humana pode ser assintomática por longos períodos de tempo, e ser transmitida congenitamente ou via transfusional, estudos epidemiológicos são necessários a fim de se estabelecer a real importância do cão como reservatório nessa área e, se necessário, estabelecer adequada vigilância epidemiológica com vistas à prevenção da infecção.

CONCLUSÕES

Um total de 10,7% dos cães da área estudada foram confirmados como chagásicos pelo TESA-blot, o que representa um alto índice de infecção nessa espécie, quando comparados a estudos anteriores no estado de Mato Grosso do Sul.

O critério preconizado pela WHO (2002) para a confirmação da infecção chagásica, utilizando dois testes convencionais (RIFI e EAE ELISA) superestimou a prevalência da doença na região estudada.

A prova TESA-ELISA foi o teste sorológico mais útil para o diagnóstico da infecção chagásica na área, com a melhor sensibilidade, especificidade e índice de concordância quando comparado ao TESA-blot.

A utilização do TESA-ELISA pode ser uma excelente opção para investigação de infecção chagásica em cães residentes em área de sobreposição de doença de Chagas e leishmaniose.

A confirmação da presença do *T. cruzi* e da *Leishmania* sp alerta para o risco de transmissão desses agentes para a população humana da área.

CAPÍTULO 3- ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO NATURAL POR *T. CRUZI* EM CÃES DE MATO GROSSO DO SUL

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo descrever normalidades e anormalidades clínicas encontradas em quatro cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*. Os animais foram selecionados a partir de exames sorológicos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunossorvente ligado à enzima com extrato alcalino de formas epimastigota de *T. cruzi* e com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (EAE ELISA e TESA-ELISA), e *Immunoblotting* com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-blot). Todos foram submetidos a exame parasitológico, exame físico, radiografia torácica, eletrocardiografia, ecocardiografia e bioquímica sérica. As alterações encontradas nos exames complementares realizados foram: aumento de ventrículo direito, arritmias do tipo bloqueio atrioventricular, *sinus arrest* e bloqueio de ramo direito, além de disfunção sistólica e diastólica. Três animais apresentaram hiperproteinemia (9,1 a 10,2 g/dL) e as atividades enzimáticas de CK (221 a 404 U/L) e CK-MB (189 a 304 U/L) revelaram valores indicativos de uma miocardite ativa. Esses são os primeiros casos descritos de cães com evidências consistentes de infecção natural pelo *T. cruzi* no Mato Grosso do Sul, e ressalta-se o alerta aos médicos veterinários para a importância clínica e o papel dessa espécie como reservatório da doença e a possibilidade de que a ocorrência dessa enfermidade em cães de Mato Grosso do Sul pode estar subestimada.

Palavras chave: cardiopatia chagásica, doença de Chagas, miocardite, TESA-blot

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida principalmente por insetos vetores da ordem Hemiptera, família Reduviidae (REY, 2001). Está distribuída em todo continente americano, ocorrendo com maior frequência na Argentina, Chile, Venezuela e Brasil. Estima-se que no Brasil 25 milhões de pessoas vivam em áreas de risco e que cinco milhões estejam infectadas (WHO, 2002).

Vários animais silvestres e domésticos são incriminados como importantes reservatórios e colaboradores na transmissão da doença, porém, os cães são descritos como reservatórios mais importantes do parasito (COHEN & GÜRTLER, 2001). MONTENEGRO et al. (2002) relataram que em áreas onde *Triatoma infestans* é o principal vetor domiciliar, a taxa de infecção por *T. cruzi* nos cães excede os valores em seres humanos.

Os cães também são vítimas comuns da doença e a única espécie capaz de desenvolver alterações patológicas crônicas, semelhantes àsquelas detectadas em humanos, podendo apresentar insuficiência cardíaca congestiva (GÜRTLER et al., 1991; BARR et al., 1991, 1995; BRADLEY et al., 2000).

Embora o Brasil seja área endêmica para doença de Chagas e o cão reconhecido como um importante reservatório do *T. cruzi*, poucos estudos caracterizaram aspectos clínicos e laboratoriais de infecções naturais da doença de Chagas. A maioria dos trabalhos com essa espécie foram realizados após inoculações experimentais ou baseados na identificação de alterações *pós-mortem* (KLEIN & CAMACHO, 1997; CAMACHO et al., 2000; TÁRRAGA et al., 2002; PASCON et al., 2007).

Devido à natureza multissistêmica da infecção e à variedade de sinais clínicos, o diagnóstico pode passar despercebido, especialmente em áreas endêmicas. A evidência de ritmos cardíacos anormais e insuficiência cardíaca congestiva com disfunção ventricular direita, justifica investigação de miocardite chagásica (KITTLESON & KIENLE, 1998).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo descrever as alterações clínicas observadas em cães chagásicos, infectados naturalmente, residentes em uma área rural endêmica para a doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados animais selecionados a partir de inquérito sorológico para doença de Chagas em 75 cães, provenientes de uma comunidade quilombola localizada na área rural do município de Jaraguari, estado de Mato Grosso do Sul.

Critérios de seleção dos animais

O critério de seleção dos animais baseou-se na presença de soropositividade em quatro testes sorológicos para doença de Chagas: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Ensaio imunossorvente ligado à enzima com extrato alcalino de formas epimastigota de *T. cruzi* (EAE ELISA), Ensaio imunossorvente ligado à enzima com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-ELISA) e *immunoblotting* com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-blot), além de testes sorológicos negativos de RIFI e ELISA para leishmaniose visceral canina.

Embora oito animais tenham sido selecionados por esse critério, apenas quatro foram utilizados. Os outros cães vieram a óbito ainda na comunidade e foram descartados pelos seus proprietários.

O grupo foi constituído por três machos e uma fêmea, todos com idade aproximada entre seis e nove anos, com peso variando de 13 a 28 kg, sem definição racial.

Os quatro animais foram encaminhados ao Laboratório de Cardiologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista-UNESP–Campus de Jaboticabal-SP, para avaliação clínica.

Exames laboratoriais

Avaliação sorológica

Para a realização das provas sorológicas foram colhidos, aproximadamente, 10 mL de sangue em tubos sem anticoagulante. Após retração do coágulo, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm durante cinco minutos para melhor separação do soro, que foi transferido para tubos plásticos tipo Eppendorf® e congelado a -20°C até o momento do uso.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *T. cruzi* utilizou como antígeno formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, segundo CAMARGO (1966) e, a RIFI para *Leishmania chagasi* usou como antígeno formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, conforme descrito por OLIVEIRA (2004). Ambas foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia, do Departamento de Patologia, da Universidade Estadual Paulista -UNESP-Campus de Jaboticabal-SP.

O ELISA com extrato alcalino de formas epimastigota de *T. cruzi* (EAE-ELISA) e antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-ELISA), o ELISA com antígeno de *Leishmania chagasi* e o *immunoblotting* com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigota de *T. cruzi* (TESA-blot) seguiram o protocolo proposto por UMEZAWA et al. (2001) e foram realizados no Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo-SP.

Todos os cães foram submetidos ao xenodiagnóstico clássico para pesquisa de *T. cruzi* segundo REY (2001) e punção aspirativa de linfonodo para pesquisa de *Leishmania* sp segundo COWELL & TYLER (1989).

Avaliação cardiovascular

O exame físico geral foi realizado segundo CAMACHO & MUCHA (2004) e observou: estado nutricional, frequência cardíaca (FC), respiratória (FR),

temperatura corporal (TC), coloração de mucosas, tamanho de linfonodos, auscultação cardíaca e respiratória.

Foram realizados os exames subsidiários de:

a) Determinação da pressão arterial sistólica e diastólica obtidas a partir da média aritmética de cinco mensurações consecutivas na artéria radial, por meio de aparelho de pressão não invasiva, do tipo oscilométrico¹, segundo técnica descrita por MUCHA & CAMACHO (2007).

b) Radiografia do tórax nas projeções ventro-dorsal e lateral e a determinação do tamanho aproximado do coração, obtido pelos métodos empírico, segundo O'BRIEN (2003), e do sistema de escala vertebral (VHS) segundo BUCHANAN & BUCHELER (1995).

c) Eletrocardiografia computadorizada (ECG) na velocidade de 50 mm/seg registrados nas derivações bipolares (I, II e III) e unipolares (aVR, aVL e aVF) em eletrocardiógrafo computadorizado². O resultado das mensurações foi considerado como a média de três ciclos cardíacos e analisado segundo TILLEY & BURTNICK (2004).

d) Ecocardiografia nos métodos bidimensional, modo-M e doppler³. A incidência foi obtida a partir da parede torácica direita entre o terceiro e o sexto espaço intercostal. Foram avaliados os cortes: longitudinal paraesternal direito quatro câmaras, longitudinal paraesternal direito cinco câmaras e transversal paraesternal direito incluindo o ápice do coração, os músculos papilares, as cordoalhas tendineas, e as válvulas mitral e aórtica.

A partir do modo-M foram avaliadas as dimensões internas do ventrículo esquerdo, a espessura do septo ventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole e em diástole (BOON, 2005). O resultado das mensurações ecodopplercardiográficas foi obtido pela média de três ciclos cardíacos.

¹ DIXTAL® modelo DX2710

² ECG-PC® Tecnologia Eletrônica Brasileira (TEB)

Exames bioquímicos do soro sanguíneo

Amostra de sangue dos cães selecionados foi colhida em frasco estéril sem anticoagulante. Após a coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, para obtenção do soro e estocadas em tubo plástico tipo Eppendorf® a -20°C até o momento da avaliação.

Todas as determinações bioquímicas seguiram a metodologia e os procedimentos indicados pelo fabricante dos *kits*⁴ reagentes comerciais utilizados.

a) Aspartato aminotransferase (AST)⁴: determinada por método cinético-UV. A AST catalisa a transferência do grupamento amina do aspartato para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato, que é reduzido a malato pela ação da enzima malato desidrogenase enquanto a NADH é oxidada a NAD^{+} . A atividade enzimática de AST é calculada pela redução da absorbância em 340nm, após conversão de NADH em NAD^{+} .

b) Alanina aminotransferase (ALT)⁴: determinada por método cinético-UV. A ALT catalisa a transferência do grupo amina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato pela ação da lactato desidrogenase enquanto NADH é oxidada em NAD^{+} . A atividade enzimática da ALT é calculada com base na redução da absorbância em 340nm, quando o NADH se transforma em NAD^{+} .

c) Creatina quinase (CK)⁴: determinada por método cinético-UV. O método baseia-se na ação catalítica da CK sobre creatinina fosfato e adenosina difosfato (ADP) formando creatinina e adenosina trifosfato (ATP). A glicose é fosforilada pelo ATP, formando glicose 6-fosfogluconato na presença do NADP^{+} . A atividade

³ 300S Pandion Vet®- Pie Medical

⁴ Gold Analisa Diagnóstica Ltda®, Belo Horizonte, MG.

enzimática da CK é calculada pelo aumento na absorbância de 340nm quando o NADP^+ é reduzido a NADPH.

d) Creatina quinase MB (CK-MB)⁴: determinada por método cinético-UV. As subunidade M são inibidas por anticorpo específico que não afeta as subunidades B. O método baseia-se na reação catalítica da enzima nas reações acopladas de hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A atividade enzimática da CK é calculada pelo aumento na absorbância de 340nm quando o NADP^+ é reduzido a NADPH, proporcional a atividade da CK-MB.

e) Lactato desidrogenase (LDH)⁴: determinada por método cinético-UV. O método baseia-se na ação catalítica do LDH que converte piruvato para lactato, enquanto o NADH é oxidado para NAD^+ . A atividade enzimática é medida pelo decréscimo da absorbância em 340nm proporcional a atividade do LDH.

f) Uréia⁴: determinada por método enzimático-colorimétrico. O método fundamenta-se na hidrólise da uréia a íons amônia e CO_2 . Os íons amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, sob ação catalisadora do nitroprussiato para formar uma substância cromógena, que medida em 600nm é diretamente proporcional à concentração de uréia.

g) Creatinina⁴: determinada por método picrato alcalino. O método baseia-se na reação da creatinina com o picrato alcalino formando um complexo vermelho medido fotometricamente. A mudança do pH do meio promove a decomposição do picrato que também é medida fotometricamente. A determinação do valor da creatinina é obtido pela diferença entre as duas leituras fotométricas.

h) Proteínas totais⁴: determinada pelo método colorimétrico-biureto. O método baseia-se na reação de peptídeos do soro com íons cobre no reativo do

biureto, que formam um complexo violeta em meio alcalino, cuja absorbância em 545nm é diretamente proporcional à concentração de proteínas séricas.

i) Albumina⁴: determinada pelo método do verde de bromocresol. O princípio baseia-se na reação da albumina com o verde de bromocresol em pH 4,0 em que a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de albumina da amostra. A leitura é realizada em comprimento de onda de 628nm.

j) Globulina total: Os teores séricos de globulina total foram determinados pela subtração dos teores da albumina dos valores das proteínas totais.

k) Relação albumina/globulina: A relação albumina/globulina foi determinada por cálculo de divisão, onde o dividendo foi composto pela concentração sérica de globulina e o divisor pela concentração sérica de albumina segundo KANEKO et al. (1997).

Todas as determinações que utilizaram *kits* comerciais foram realizadas com analisador semi-automático⁵.

⁵ Modelo BIO 200F, BIOPLUS, São Paulo

Análise Estatística

Os valores obtidos nas avaliações de pressão arterial, eletrocardiografia computadorizada e ecodopplercardiografia foram tabulados e analisados em planilha do Excell para o cálculo das médias e desvios-padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a positividade dos animais tenha sido confirmada pelos testes sorológicos, a presença de *T. cruzi* circulante foi demonstrada em apenas dois (50%) dos quatro animais submetidos ao xenodiagnóstico (animais 1 e 3). Esses achados são similares aos observados em seres humanos e em primatas não-humanos (BRAZ et al., 2001; CARVALHO et al., 2003) e podem estar associados à escassez do *T. cruzi* no sangue periférico devido à provável forma crônica da doença.

Ao exame físico todos os animais apresentavam boa condição corporal, e as variáveis, frequência cardíaca (FC), respiratória (FR), temperatura corporal (TC), coloração de mucosas, tamanho de linfonodos, auscultação cardíaca e respiratória, apresentaram-se dentro dos parâmetros de normalidade. Semelhante ao que ocorre em humanos, a intensidade das manifestações está na dependência da idade do animal e do tipo de cepa envolvida na infecção (SANCHEZ-GUILLÈN et al., 2006). BARR et al. (1991) estudaram cães de diferentes faixas etárias e observaram que os sinais foram menos severos em animais mais velhos, acima de 13 semanas de idade, com manifestações discretas de depressão e anorexia. Portanto, a idade, o desconhecimento do período em que esses animais foram expostos ao agente, assim como o tipo de cepa circulante, podem justificar a ausência de sinais durante o exame físico.

A média dos valores das pressões arteriais sistólicas e diastólicas encontravam-se entre os limites médios de normalidade (Tabela 6) segundo KITTLESON & KIENLE (1998), e corroboram as observações de estudos com infecção experimental (ALVES, 2003).

Na avaliação radiográfica empírica do tamanho cardíaco observou-se um aumento focal do ventrículo direito na projeção radiográfica lateral, dos animais 1, 2 e 3 (Figuras 10, 11 e 12), confirmado pelo método do VHS no animal 3, que apresentou um índice 11,0. O comprometimento do ventrículo direito é encontrado frequentemente em humanos e cães chagásicos, e pode manifestar-se associado

a sinais de congestão venosa sistêmica nos pacientes que desenvolvem insuficiência cardíaca (BARR et al., 1989; XAVIER et al., 2006; CAMACHO & ALVES, 2007). Apesar de não terem sido verificados sinais clínicos de insuficiência cardíaca, o aumento do ventrículo direito pode ser considerado uma alteração relacionada à infecção por *T. cruzi*.

Tabela 6. Valores médios e desvios-padrão obtidos da Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Pressão Arterial Média (PAM), obtida por meio do método oscilométrico, dos cães naturalmente infectados pelo *T. cruzi*.

Animal	PAS(mmHg)	PAM(mmHg)	PAD(mmHg)
1	162,2 ± 16,71	125 ± 18,60	99,2 ± 17,60
2	136,4 ± 18,49	101 ± 17,84	83,6 ± 8,50
3	140,6 ± 12,89	100,2 ± 8,64	74,6 ± 9,83
4	140,8 ± 12,91	104,84 ± 12,91	78,70 ± 7,72

Dos quatro cães, três (animais 1, 2 e 4) apresentaram aumento na duração da onda P e três (animais 1, 2 e 3) apresentaram aumento da duração do complexo QRS (Tabela 7) no ECG, que, embora possa indicar aumento de câmara cardíaca atrial e ventricular esquerda não foi confirmado pelos outros métodos de avaliação, e pode estar associado à presença de áreas de fibrose intramiocárdica causada pela ação do *T. cruzi*. Estudos ultraestruturais em pacientes chagásicos confirmaram a ocorrência de miocardite granulomatosa com necrose e fibrose em cardiomiócitos, células especializadas do sistema de condução átrio ventricular e neurônios do gânglio autônomo cardíaco, que provoca um retardo na condução e alargamento de onda (LANA et al. 1988; BARR et al., 1989; ANDRADE et al., 1997; KITTLESON & KIENLE, 1998).

Tabela 7. Valores médios e desvios-padrão obtidos por meio de eletrocardiografia para Frequência cardíaca, duração da onda P, intervalo PR, complexo QRS, intervalo QT, amplitude das ondas P e R e ritmo dos cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*.

Animal	FC bpm	P (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	P (mV)	R (mV)	ritmo
1	148,33±3,79	55,67±2,31	104,33±2,31	93,67±1,15	211,33±5,13	0,16±0,01	0,65±0,01	RS com BRD
2	167±14,73	67,67 ±6,81	101,00 ±3,46	61,00± 1,73	196,33 ±11,55	0,12± 0,06	1,11± 0,06	ASR
3	70,67± 9,07	44,33± 2,31	165,33 ±20,40	72,33± 4,04	255,67± 2,31	0,17± 0,05	1,49± 0,04	ASR com BAV 1° e parada sinusal
4	115,33± 7,51	53,67± 4,04	101,67± 1,53	52,67± 3,51	200,33± 2,52	0,14± 0,02	0,96± 0,02	ASR

FC= frequência cardíaca; bpm= batimentos por minuto; ms= milissegundos; mV= milivolts; RS= ritmo sinusal; BRD= bloqueio de ramo direito; ASR= arritmia sinusal respiratória; BAV 1° = bloqueio atrioventricular de primeiro grau.

Arritmias do tipo parada sinusal, BAV 1^o (Tabela 7, Figura 12) e BRD (Tabela 7, Figura 10) também foram identificados nos animais 3 e 1, respectivamente, e corroboram as observações de XAVIER et al. (2006) e PASCON (2007) que verificaram que, apesar de não existir um padrão eletrocardiográfico específico para os distúrbios de condução na cardiopatia de etiologia chagásica, o parasito compromete principalmente as vias de condução átrio ventriculares e os ramos do feixe de Hiss, levando ao aumento da frequência de bloqueios atrioventriculares, bloqueio de ramo e extrasístoles (BARR et al., 1992; ALVES, 2003; CARVALHO et al., 2003).

Apenas um dos cães (animal 4) apresentou padrões radiográficos normais e arritmia sinusal respiratória com marca passo migratório no ECG (Tabela 7, Figura 13), considerados sem significância clínica (TILLEY & BURTNICK, 2004). Estudos com inoculação experimental em cães observaram que, com a evolução do quadro clínico, os episódios arrítmicos desaparecem progressivamente e podem justificar os achados clínicos normais e indicar a forma crônica indeterminada da doença (LANA et al., 1988; BARR et al., 1992; ALVES, 2003).

Durante a ecocardiografia, foi possível determinar redução na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo no animal 3 (Tabela 8), sugestivo de disfunção sistólica, espessamento de parede livre do ventrículo esquerdo em diástole nos animais 1, 2 e 3, com aumento do pico de velocidade da onda A da válvula mitral nos animais 1 e 2 (Tabela 9; Figuras 10 e 11), indicativos de disfunção diastólica; corroborando as alterações observadas por ALVES (2003) e SICILIANO et al. (2006) na fase crônica da cardiopatia chagásica experimental. Ressalta-se aqui a relevância da ecodopplercardiografia como recurso a ser incorporado na avaliação cardiovascular antes de se estabelecer a forma indeterminada da doença. Embora existam muitas variações nas alterações relatadas por diferentes autores, o exame ecodopplercardiográfico é considerado um método complementar importante para a investigação de anormalidades funcionais da

Tabela 8. Valores médios e desvios-padrão obtidos por meio de ecocardiografia em modo M dos cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*.

Animal	Peso (Kg)	SIVd (cm)	DVEd (cm)	PVEd (cm)	SIVs (cm)	DVEs (cm)	PVEs (cm)	FS (%)	AE (cm)	Ao (cm)	AE/Ao
1 **	22,4	1,08±0,13 (0,93-1,02)	3,97±0,11 (2,90-4,07)	0,95±0,13 (0,75-0,82)	1,35±0,21 (1,40-1,50)	2,40±0,13 (1,67-2,69)	1,35±0,09 (1,21-1,31)	40±10,2 (33-46)	2,34±0,40 (1,86-3,39)	2±0,20 (1,47-2,84)	1,17±0,02 (0,83-1,13)
2 **	23,7	0,61±0,17 (0,95-1,04)	3,11±0,09 (2,96-4,13)	0,94±0,19 (0,76-0,84)	1,13±0,16 (1,43-1,53)	1,66±0,21 (1,71-2,73)	1,51±0,20 (1,23-1,33)	46±6,71 (33-46)	2,35±0,35 (1,91-3,44)	1,85±0,18 (1,51-2,88)	1,27±0,11 (0,83-1,13)
3 **	22,3	1,03±0,21 (0,93-1,02)	3,05±0,13 (2,90-4,07)	0,94±0,20 (0,75-0,82)	1,30±0,13 (1,40-1,50)	2,72±0,14 (1,67-2,69)	1,28±0,10 (1,21-1,31)	29±3,22 (33-46)	2,85±0,42 (1,86-3,39)	2,41±0,12 (1,47-2,84)	1,18±0,11 (0,83-1,13)
4 **	13,0	0,83±0,20 (0,79-0,90)	2,50±0,11 (2,41-3,58)	0,64±0,10 (0,63-0,72)	1,08±0,20 (1,19-1,31)	1,45±0,05 (1,33-2,35)	1,03±0,20 (1,04-1,15)	42±6,45 (33-46)	1,74±0,20 (1,42-2,95)	1,64±0,32 (1,12-2,50)	1,06±0,09 (0,83-1,13)

DVDd= diâmetro do ventrículo direito em diástole; SIVd= septo interventricular em diástole; DVEd= diâmetro do ventrículo esquerdo; PVEd= parede livre do ventrículo esquerdo em diástole; SIVs= septo interventricular em sístole; DVEs= diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole; PVEs=Parede do ventrículo esquerdo em sístole; FS= Fração de encurtamento; AE= átrio esquerdo; Ao= aorta; AE/Ao= relação átrio esquerdo/aorta.

**Valores ecocardiográficos de referência para os parâmetros relacionados ao tamanho corporal dos cães segundo BOON (2005).

Tabela 9. Valores médios e desvios-padrão dos picos de velocidade das ondas E e A das válvulas mitral e aórtica obtidos por meio de ecodopplercardiografia dos cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*.

Animal	VME (m/s)	VMA (m/s)	E/A _M	VTE (m/s)	VTA (m/s)	E/A _T
1	0,73±0,10	0,80±0,33	0,91±0,15	0,52±0,12	0,42±0,15	1,23±0,63
2	0,45±0,14	0,62±0,27	0,73±0,20	0,52±0,15	0,45±0,18	1,16±0,10
3	0,80±0,20	0,37±0,12	2,16±0,10	0,49±0,14	0,37±0,15	1,64±0,63
4	0,92±0,15	0,64±0,02	1,43±0,10	0,92±0,10	0,73±0,10	1,26±0,17

VME= pico de velocidade da onda E da válvula mitral; VMA= pico de velocidade da onda A da válvula mitral; E/A_M= relação entre as ondas E e A da válvula mitral; VTE= pico de velocidade da onda E da válvula tricúspide; VTA= pico de velocidade da onda A da válvula tricúspide; E/A_T= relação entre as ondas E e A da válvula tricúspide.

cardiopatia chagásica em pacientes sorologicamente positivos (BARR et al., 1989; MARIN-NETO et al., 2002; CARVALHO et al., 2003; ZABALGOITIA et al., 2003).

As atividades séricas de ALT, AST, LDH e os teores de uréia e creatinina do soro sangüíneo estavam dentro dos valores de referência para a espécie, em todos os animais. Os valores de CK variaram de 221 a 404 U/L e CK-MB de 189 a 304 U/L e estavam acima dos intervalos de normalidade propostos por LOPES et al. (2005) e AMARAL et al. (1996) nos quatro cães estudados (Tabela 10), sugerindo lesão miocárdica. Estes resultados assemelham-se aos de ALVES (2003), que observou que os níveis séricos de CK permaneceram elevados até quatro meses após infecção experimental de cães pelo *T. cruzi*, e atribuiu esses valores ao desenvolvimento de miocardite. Por outro lado, discordam de BARR et al. (1991) que concluíram que essa enzima não é indicador de tripanosomíase em cães já que, segundo eles, esses aumentos ocorreriam ocasionalmente. Nenhum dos autores consultados utilizou a CK-MB embora seja um parâmetro freqüentemente usado no diagnóstico de lesões miocárdica em humanos (CAMAROZANO & HENRIQUES, 1996).

Os valores de proteínas e globulinas totais mostraram-se elevados e a relação albumina/ globulina diminuída em todos os animais (Tabela 10), e, embora não corroborem os estudos experimentais de BARR et al. (1991) e ALVES (2003), essa disproteinemia pode estar associada à hipergamaglobulinemia devido ao estímulo antigênico provocado pelo parasito, como observado em infecção canina causada por outros tripanosomatídeos (FEITOSA et al., 2000; AQUINO et al., 2002).

A presença de infecção natural nesses animais reabre a questão da importância do cão na epidemiologia da doença de Chagas e sugere um alerta aos veterinários para a existência dessa enfermidade. A virulência da cepa circulante, o período e a forma de infecção, além de características imunogênicas individuais podem ser determinantes na evolução da infecção chagásica, contudo, essas variáveis permanecem desconhecidas e reafirmam a necessidade de novos estudos na região.

Tabela 10. Atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK), porção MB da creatina quinase (CK-MB), uréia, creatinina, proteínas totais (PT), albumina, globulinas totais (GT) e relação: albumina/globulina obtidas (A/G) dos cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*.

	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	PT (g/dL)	Albumina (g/dL)	GT (g/dL)	A/G
*referencia (21-102)	(22-66)	50-495	24-170	11-38,8	15-65	0,5-1,5	5,4-7,1	2,6-3,3	2,7-4,4	0,9	
Animal 1	44,3	32,6	326	354	298	32,4	0,9	10,2	2,5	7,7	0,32
Animal 2	46,6	32,4	178	221	189	31,6	0,7	8,6	3,0	4,6	0,65
Animal 3	43,3	26,5	404	321	194	38,4	0,9	9,1	2,5	6,7	0,37
Animal 4	50,2	32,6	168	404	304	24,8	0,8	7,6	2,8	5,8	0,48

*Fonte dos valores de referência de ALT, AST, LDH, Uréia, Creatinina, PT, albumina, GT e A/G: KANEKO et al., (1997).

*Fonte dos valores de referência de CK e CK-MB: LOPES et al. (2005)

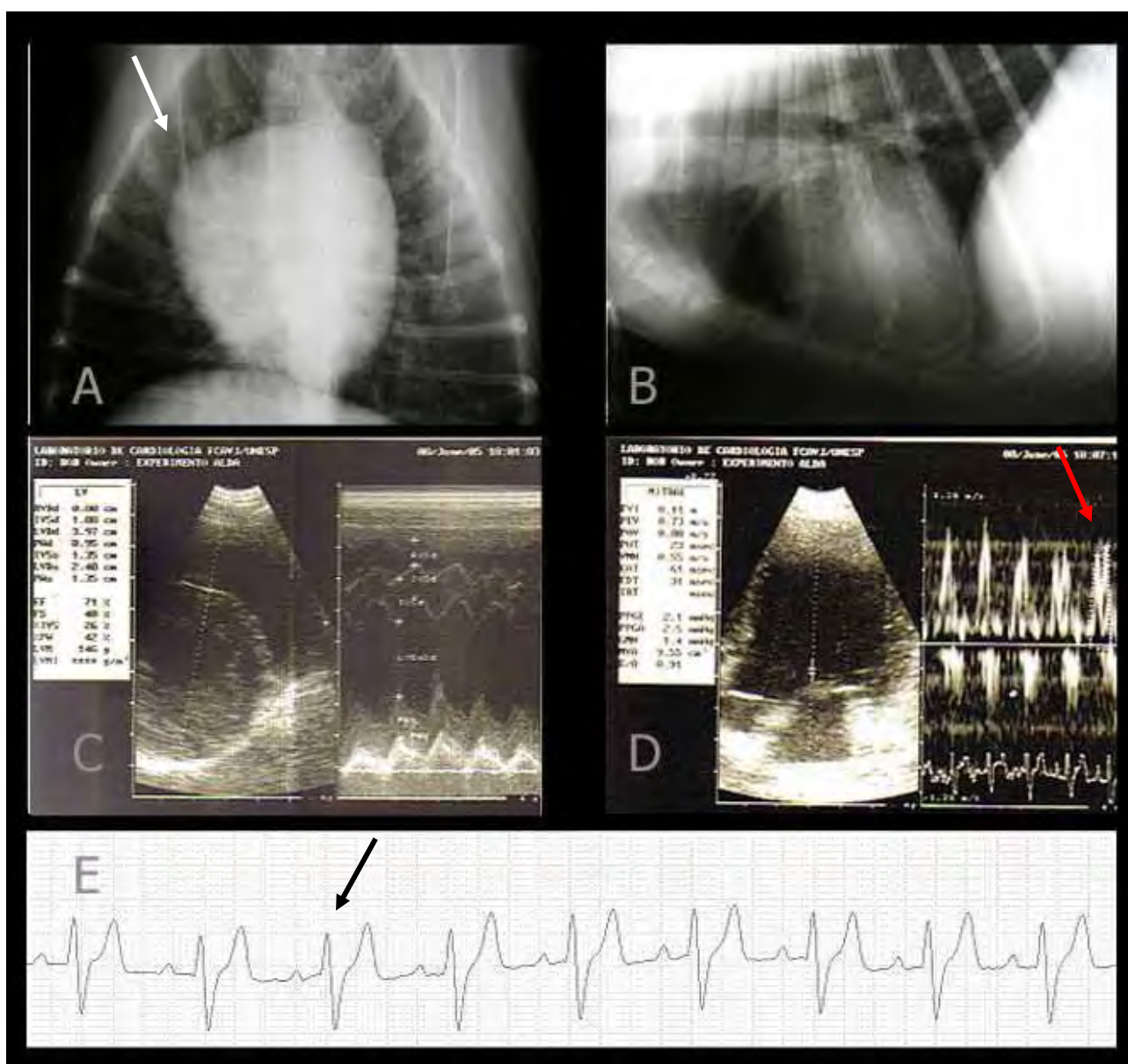


Figura 10. Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal (A) e latero-lateral (B), imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M (C), imagem doppler do fluxo da válvula mitral (D) e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II (E) do animal 1: Nota-se aumento de ventrículo direito identificado pelo método empírico (seta branca), espessamento de parede livre do ventrículo esquerdo em diástole, aumento do pico de velocidade da onda A (seta vermelha) e bloqueio de ramo direito (seta preta).

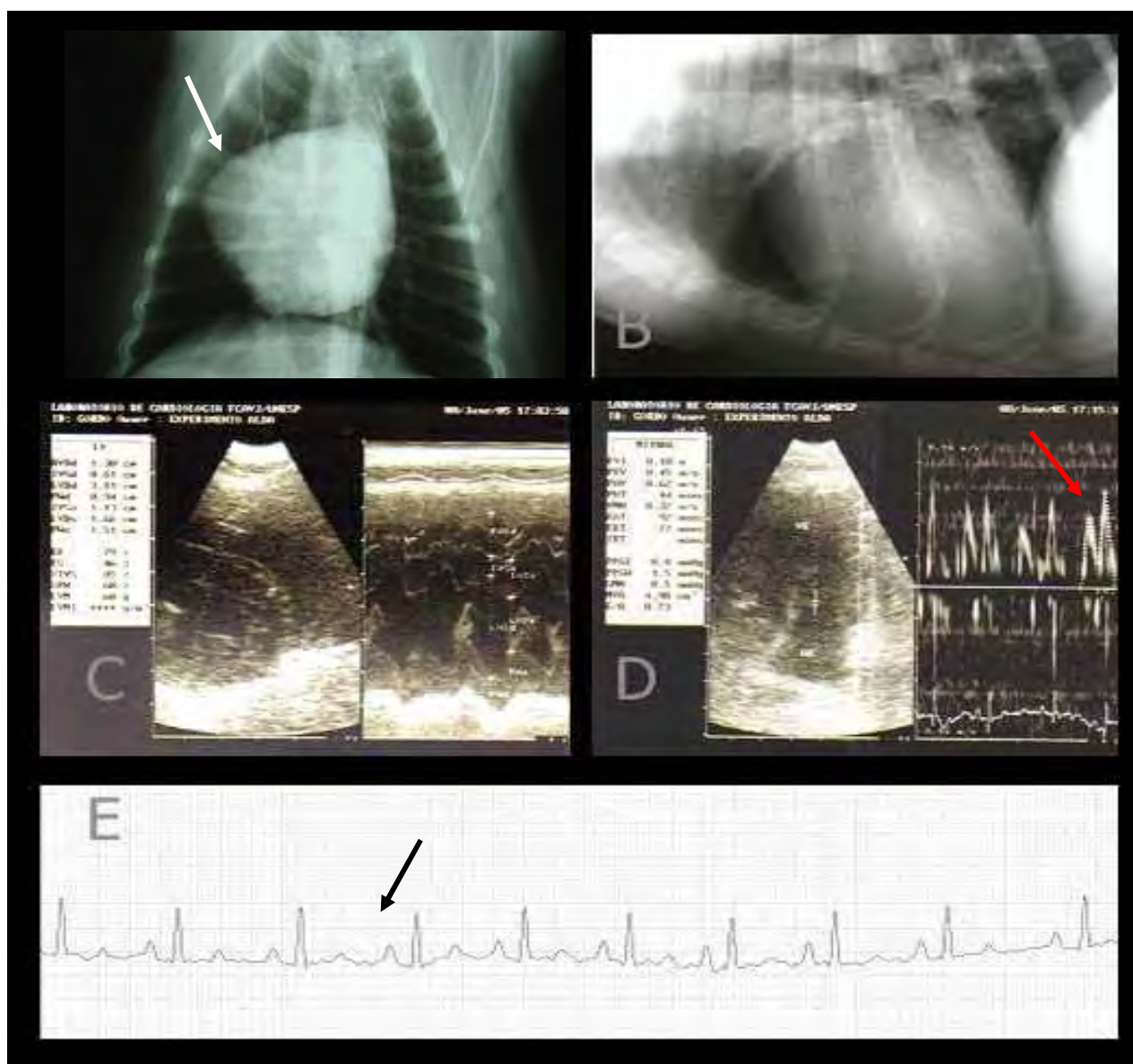


Figura 11. Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal (A) e latero-lateral (B), imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M (C), imagem doppler do fluxo da válvula mitral (D) e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II (E) do animal 2: nota-se aumento de ventrículo direito identificado pelo método empírico (seta branca), espessamento de parede livre do ventrículo esquerdo em diástole, aumento do pico de velocidade da onda A (seta vermelha) e arritmia sinusal respiratória (seta preta).

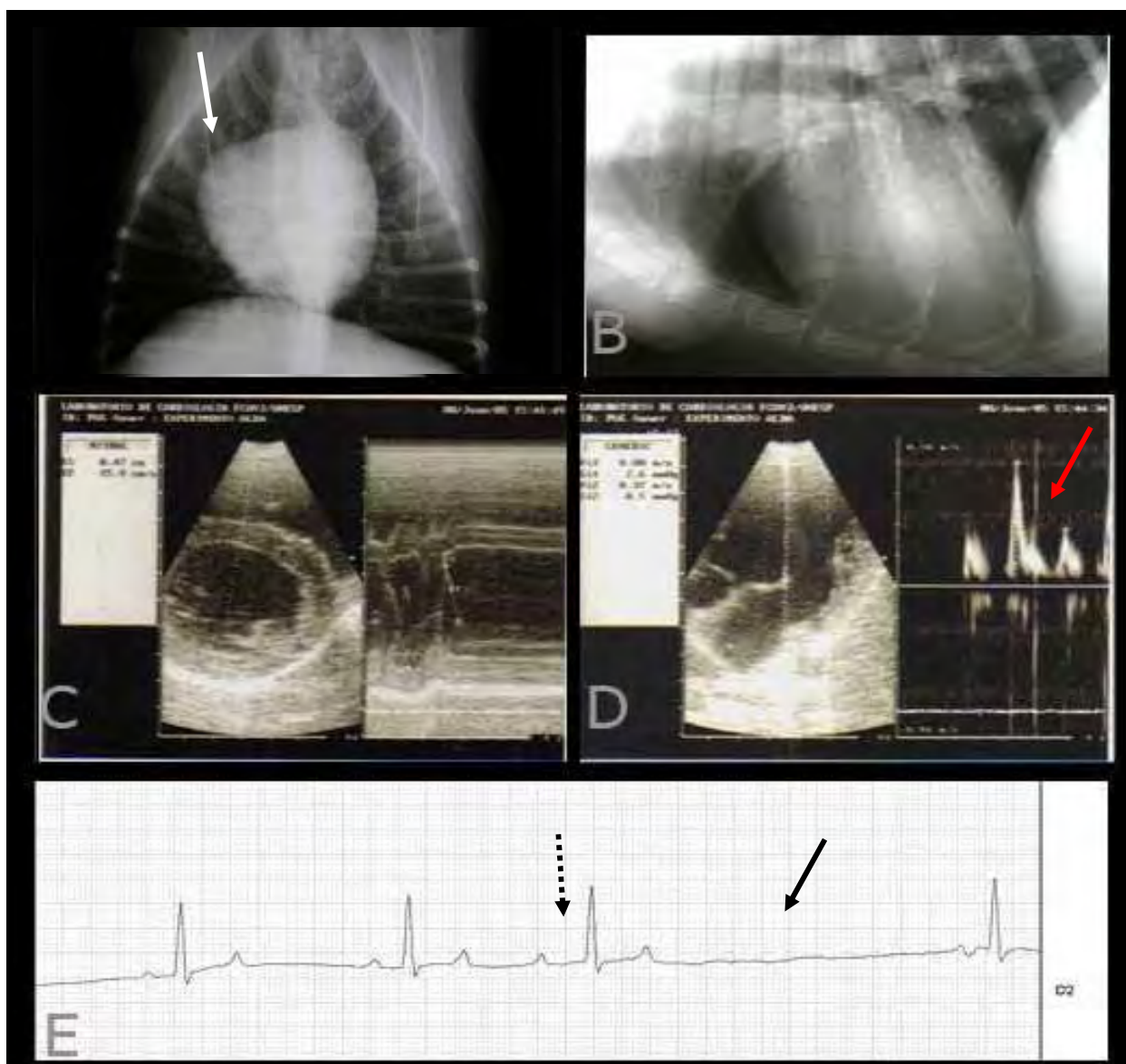


Figura 12. Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal (A) e latero-lateral (B), imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto nos modos B e M (C), imagem doppler do fluxo da válvula mitral (D) e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II (E) do animal 3: nota-se aumento de ventrículo direito identificado pelo método empírico (seta branca) e do VHS, espessamento de parede livre do ventrículo esquerdo em diástole, imagem doppler do fluxo da válvula mitral normal (seta vermelha), bloqueio átrio ventricular de 1º grau (seta preta com linha pontilhada) e *sinus arrest* (seta preta com linha contínua).

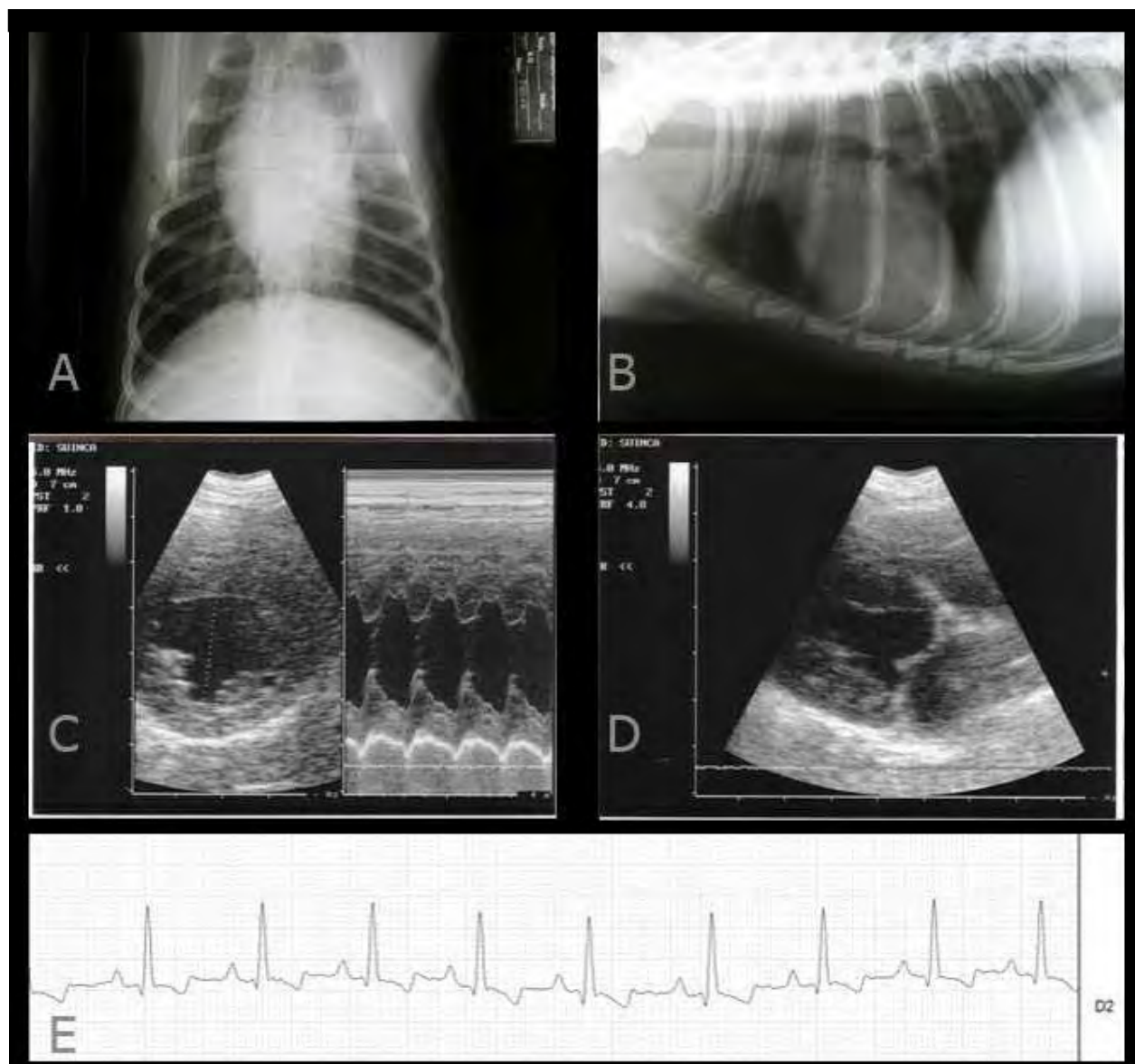


Figura 13. Exames radiográficos nas projeções ventrodorsal (A) e latero-lateral (B), imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo curto no modo B e M (C), imagens ecocardiográficas paraesternal direita eixo longo no modo B e traçado eletrocardiográfico computadorizado na derivação II do animal 4: nota-se normalidade nas avaliações radiográficas e ecocardiográficas, associadas a presença de arritmia sinusal respiratória e marcapasso migratório.

CONCLUSÕES

Esses são os primeiros casos descritos de cardiopatia chagásica em cães, infectados naturalmente, residentes em Mato Grosso do Sul.

Os valores elevados de CK, CK-MB, associados às alterações observadas nos exames de avaliação cardiovascular sugerem uma injúria miocárdica.

Os valores elevados de proteínas totais, globulinas e a redução na relação albumina/globulina sugerem um estímulo antigênico persistente.

Os resultados dos exames radiográficos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos confirmaram a cardiopatia chagásica e foram fundamentais para a determinação da disfunção miocárdica.

As alterações clínicas identificadas reafirmam a capacidade do cão em desenvolver a forma clínica cardíaca semelhante à dos seres humanos.

REFERÊNCIAS*

AGUIAR, J.I.; AGUIAR, E.S. Serologic testing for Chagas disease and HIV in counseling programs and blood banks in Midwest Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.3, p.176-179, 1999.

ALVES, R.O. **Avaliações ecodopplercardiográfica, eletrocardiográfica computadorizada e dinâmica (Sistema Holter) e clinico-patológica em cães com cardiopatia chagásica experimental**. Jaboticabal, SP. 2003. 89p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista.

AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; HENNEMANN, C.R.A. Valores de referência de constituintes bioquímicos séricos para cães da região de Santa Maria, RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.2/3, n.1, p.71-76, 1996.

AMATO NETO, V.; DE MARCHI, C.R.; FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.W. Observações sobre o TESA-blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.6, p.534-535, 2005.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; SOBRAL, K.S.C.; ROSADO, A.P.; OLIVEIRA, F.L.S. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas durante o surto agudo de doença de Chagas por transmissão oral, em Santa Catarina, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, supl. I, p.7, 2006.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD, R.J.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. The indeterminate phase of chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n.3, p.328-336, 1997.

* ABNT. Agosto, 2002.

AQUINO, L.P.C.T.; MACHADO, R.Z.; ALESSI, A.C.; SANTANA, A.E.; CASTRO, L.C.; MARQUES, L.C.; MALHEIROS, E.B. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3, p.8-18, 2002.

ARAÚJO, F.M.G.; BAHIA, M.T.; MAGALHÃES, N.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TAFURI, W.L.; LANA, M. Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and sorological methods. **Acta Tropica**, v.81, p.21-31, 2002.

ARAÚJO-JORGE, T.C. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, n.4, p.441-462, 1989.

BARBOZA, S.F.C.; PEREIRA, D.S.; RAMOS, M. Doença de Chagas: reatividade cruzada na reação de imunofluorescência indireta. **Revista da UNIMAR**, v.13, n.1, p.11-9, 1991.

BARR, S.C.; GOSSET, K.A.; KLEI, T.R. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observation of trypanosomiasis in dog infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.6, p.954-960, 1991.

BARR, S.C.; HOLMES, R.A.; KLEI, T.R. Electrocardiographic and echocardiographic features of trypanosomiasis in dog inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. **America Journal of Veterinary Research**, v.53, n.4, p.521-527, 1992.

BARR, S.C.; SIMPSON, M.; SCHMIDT, S.; BUNGE, M.M.; AUTHEMENT, J.M.; LOZANO, F. Chronic dilatative myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.9, p.1237-1241, 1989.

BARR, S.C.; VAN BEEK, O.; CARLISLE-NOWAK, M.S.; LOPEZ, J.W.; KIRCHCHOFF, L.V.; ALLISON, N.; ZAJAC, A.; LAHUNTA, A.; SCHLAFFER, D.H.; CRANDALL, W.T.

Trypanosoma cruzi infection in Walker hounds from Virginia. **America Journal of Veterinary Research**, v.56, n.8, p.1037-1044, 1995.

BERRIZBEITIA M.; NDAO, M.; BUBIS, J.; GOTTSCHALK, M.; ACHÉ, A.; LACOUTURE, S.; MEDINA, M.; WARD, B.J. Purified Excreted-Secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.2, p.291-296, 2006.

BOON, J.A. **Ecocardiografia Bidimensional e em Modo-M para o Clínico de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca LTDA, 2005. 97p.

BORGES-PEREIRA, J.; ZAUGA, P.L.; GALHARDO, M.C.; CUNHA, R.V. Chagas disease in the State of Mato Grosso do Sul. Sero-epidemiologic aspect of the infection in sanitarian District of Rio Verde. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.123-124, 1999.

BORGES-PEREIRA, J.; ZAUZA, P.L.; GALHARDO, M.C.; NOGUEIRA, J.S.; PEREIRA, G.R.O.L.; CUNHA, R.V. Doença de Chagas na população urbana do distrito sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.5, p.459-466, 2001.

BRADLEY, K.K.; BERGMAN, D.K.; WOODS, J.P.; CRUTCHER, J.M.; KIRCHHOFF, L.V. Prevalence of American trypanosomiasis (Chagas disease) among dogs in Oklahoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, n.12, p.1853-185, 2000.

BRAZ, L.M.A.; AMATO NETO, V.; CARAGNANI, F.L.; DE MARCHI, C.R. *Trypanosoma cruzi* parasitemia observed in immunocompromised patients: the importance of the artificial xenodiagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n.2, p.113-115, 2001.

BUCHANAN, J. W.; BÜCHELER, J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, n.2, p.194-199, 1995.

CAMACHO, A.A., ALVES, R.O. Cardiopatia chagásica en caninos. In: BELERENIAN, G., MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A.; GRAU, J.M. **Afecciones cardiovasculares en pequeños animales**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2007. Cap.21, p.289-295.

CAMACHO, A.A., MUCHA, C.J. Semiologia do sistema circulatório de cães e gatos. In: FEITOSA, F.L. **Semiologia veterinária a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. Cap. 6, p.282-311.

CAMACHO, A.A.; TEIXEIRA, M.S.S.; ALVES, R.O. Eletrocardiography in adult dogs infected with *Trypanosoma cruzi* during acute and chronic phases. **ARS Veterinária**, v.16, n.3, p.158-164, 2000.

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

CAMAROZANO, A.C.A.; HENRIQUES, L.M.G. Uma macromolécula capaz de alterar o resultado da CK-MB e induzir ao erro no diagnóstico de infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v.66, n.33, p.143-147, 1996.

CARVALHO, C.M.E.; ANDRADE, M.C.R.; XAVIER, S.S.; MANGIA, R.H.R.; BRITTO, C.C.; JANSEN, A.M., FERNANDES, O.; LANNES-VIEIRA, J. BONECINE-ALMEIDA, M.G. Chronic Chagas's disease in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Evalution of parasitemia, serology, eletrocardiography, echocardiography, and radiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.6, p.683-691, 2003.

CASTRO, A. R. C. M. **Estudo da prevalência da hepatite B na comunidade Afro-descendentes de Furnas dos Dionísios em Mato Grosso do Sul**. 2000. 152p.

Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Mato Grosso, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

CHIARAMONTE, M.G.; FRANK, F.M.; FURER, G.M.; TARANTO, N.J.; MARGNIR.A.; MAALCHIODI, E.L. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, v.72, p.295-308, 1999.

CHIARAMONTE, M.G.; ZWIRNER, N.W.; CAROPRESI, S.L.; TARANTO, N.J.; MALCHIODI, E.L. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Human mixed infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.54, p.271-273, 1996.

CHIARY, E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, suppl 1, p.299-300, 1999.

CHILLER, T.M.; SAMUDIO, M.A.; ZOULEK, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas's disease and leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.6, p.650-656, 1990.

COHEN, J.E.; GÜRTLER, R.E. Modeling household transmission of American Trypanosomiasis. **Science**, v.293, p.694-698, 2001.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n.1, p.21-25, 1991.

COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C.V., FERNANDES, O., VALENTE, S.A.S., MILES, M.A. Emerging chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, n.4, p.171-176, 2002.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Diagnostic cytology of the dog and cat**. 3 ed. Goeta: American Veterinary Publication, 1989, 260p.

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, n.3, p.247-254, 2006.

DAWSON B., TRAPP R.G. **Estatística Básica e Clínica**. 3a. ed, Rio de Janeiro: Mac-Graw Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2003, 102p.

DEVERA, R., FERNANDES, O., COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.1, p.1-12, 2003.

DIAS, J.C.P. Control of Chagas Disease in Brazil. **Parasitology Today**, v.3, p. 336-341, 1987.

DIAS, J.P.C. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, p.43-59, 2002.

DIOSQUEZ, P., PADILLA, A.M., CIMINO, R.O, CARDOZO, R.M., NEGRETTE, O.S., MARCO, J.D., ZACCA, R., MEZA, C., JUAREZ, A., ROJO, H., REY, R., CORRALES, R.M., NASSER, J.R., BASOMBRIIO, M.A. Chagas disease in rural areas of chaco province, Argentine: Epidemiologic survey in human, reservoirs and vector. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p.590-593, 2004.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.25, p.36-44, 2000.

FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.M. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. **São Paulo Medical Journal**, v.113, n.2, p.767-771, 1995.

FERREIRA, I.L.M., SILVA, T.P.T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.5, p.507-509, 2006.

FOX, J.C.; EWING, S.A.; BUCKNER, R.G.; WHITENACK, D.; MANLEY, J.H. *Trypanosoma cruzi* in a dog from Oklahoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, n.12, p.1583-1584, 1986.

FRADE, A.F. **Aplicação do teste TESAcruzi como confirmatório para a sorologia da doença de Chagas, em amostras de sangue digital de crianças de 0 a 5 anos, colhidas de diferentes regiões do Brasil**. São Paulo, SP. 2005. 18p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

FRANK, F.M.; FERNÁNDEZ, M.M.; TARANTO, N.J.; CAJAL, S.P.; MARGNI R.A.; CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MALCHIODI, E.L. Characterization of human infection by *Leishmania* spp in the northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosome cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, v.126, p.31-39, 2003.

FURUCHO, C.R. **Diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue: linfoproliferação, detecção de anticorpos e estudo epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas inconclusivas**. São Paulo, SP. 2006. 93p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p.230-250, 1993.

GURTLE R.E.; SOLARD, N.D.; LAURICELLA, M.A.; HAEDO, A.S.; PIETROKOVSKI, S.M.; ALBERTI, A.A.; WISNIVESKY-COLLI, C. Dynamic of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural área 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.; CÉCERES, M.C.; RUBEL, D.N.; PETERSEN, R.M.; SCHWEIGMANN, M.A.; LAURICELLA, M.A.; BUJAS, M.A.; SEGURA, E.L.; WISNIVESKY-COLI, C. Chagas disease in north-west Argentina: infected dog as a risk factor for the domestic transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.741-745, 1991.

GUSMÁN-BRACHO, C., GARDIA-GARCIA, L., FLORIÁN-VERDUGO, J., GUERRERO-MARTINEZ, S. TORRES-COSME, M., RAMIREZ-MELGAREJO, E.A. Riesgos de transmission de *T. cruzi* por transfusion de sangre. **Revista Panamericana de Saúde Pública**, v.4, n.2, p.590-601, 1998.

HERRERA, L., D'ANDREA, P.S., XAVIER, S.C.C., MANGIA, R.H., FERNANDES, O., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park "Serra da Capivara" and its surroundings (Piauí, Brazil) an endemic area for Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, p.379-388, 2005.

HERRERA, L., URBANETA-MORALES, S. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the Valley of Caracas, Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, n.5, p.1-8, 1997.

KANEKO, J.J. HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed., San Diego: Academic Press, 1997, p.932.

KESPER Jr, N.; ALMEIDA, K.A.; STOLF, A.M.; UMEZAWA, E.S. Immunoblot analysis of trypomastigotes excreted-secreted antigen as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* and isolates. **International Journal for Parasitology**, v.86, p.862-867, 2000.

KITTLESON, D.M; KIENLE, R.D. **Small Animal Cardiovascular Medicine**. California: Mosby, 1998. 932p.

KLEIN, R.P.; CAMACHO, A.A. Electrocardiography evaluation of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* during the acute and indeterminate chronic phases of infection. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, n.6, p.337-344, 1997.

LANA, M.; TAFURI, 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.

LAURICELLA, M.A.; SINAGRA, A.J.; PAULONE, I.; RIARTE, A.R.; SEGURA, E.L. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dog of endemic areas of the Argentine Republic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 2, p.63-70, 1998.

LAURICELLA, M.A.; CASTAÑERA, M.B.; GÜRTLER, R.E.; SEGURA, E.L. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) infection in naturally infected dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.4, p.501-507, 1998a.

LIMA, H., CARRERO, J., RODRÍGUEZ, A., GUGLIELMO, Z., RODRÍGUEZ, N. Trypanosomatidae de importância em saúde pública em animais silvestres y sinantrópicos em um área rural del municipio Tovar del estado Mérida, Venezuela. **Biomédica**, v.26, p.42-50, 2006.

LOPES, S.T.A.; FRANCISCATO, C.; TEIXEIRA, L.V.; OLIVEIRA, T.G.M.; GARMATZ, B.C.; MEDEIROS, A.P.; MAZZANTI, A. Determinação da creatina quinase em cães. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.12, n.1, p.31-37, 2005.

MACHADO, E.M.M.; FERNANDES, A.J.; MURTA, S.M.F.; VITOR, R.W.A.; CAMILO JUNIOR, D.L.; PINHEIRO, S.W.; LOPES, E.R.; ADAD, S.J.; ROMANHA, A.J.; PINTO DIAS, J.C. A study experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.6, p.958-965, 2001.

MALCHIODI, E.L.; CHIARAMONTE, M.G.; TARANTO, N.J.; ZWIRNER, N.W.; MARGNI, R.A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp: the use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag 163B6). **Clinical Experimental Immunology**, v.97, p.417-423, 1994.

MARIN-NETO, J.A.; ALMEIDA FILHO, O.C.; PAZIN-FILHO, A.; MACIEL, B.C. Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterização e perspectiva de tratamento precoce da cardiomiopatia. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v.79, n.6, p.623-627, 2002.

MATSUMOTO, T.K., HOSHINO-SHIMIZU, P.M., NAKAMURA, H.F., ANDRADE, Jr., UMEZAWA, E.S. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of diferents clinical forms of Chaga`s disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1484-1492, 1993.

MEURS, K.; ANTHONY, M.A.; SLATER, M.; MILLER, M.W. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.213, n.4, p.497-500, 1998.

MONTENEGRO, V.M., JIMÉNEZ, M., PINTO DIAS, J.C., ZELEDÓN, R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 4, p.491-494, 2002.

MONTEÓN-PADILHA, V.M., HERNÁNDEZ-BECERRIL, N., GUZMÁN-BRACHO, C., ROSALES-ENCINAS, J.L., REYES-LOPES, P.A. American tripanosomiasis (Chagas disease) and blood banking in México City: Seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. **Archives of Medical Research**, v.30, p.393-398, 1999.

MS-MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA. **MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Determinación de la presión arterial. In: BELERENIAN, G., MUCHA, C.; CAMACHO, A.A.; GRAU, J.M. **Afecciones cardiovasculares en pequeños animales**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2007. Cap.8, p.179-183.

NAKAZAWA, M.; ROSA, D.S.; PEREIRA, V.R.A.; MOURA, M.O.; FURTADO, V.C.; SOUZA, W.V.; BARROS, M.N.D.S.; ABATH, F.G.C.; GOMES. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas's disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.5, p.1024-1027, 2001.

O'BRIEN, R. **Radiografia torácica para o Clínico de Pequenos Animais**. Tradução de Carla Ap. Batista Lorigados. São Paulo: Roca LTDA, 2003. 146p.

OLIVEIRA, T.M.F.S. **Deteção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em soros de cães do Município de Jaboticabal, área não-endêmica para a doença**. Jaboticabal, SP. 2004. 45p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

PASCON, J.P.E.P. **Avaliação clínica da cardiopatia chagásica crônica em cães**. Jaboticabal, SP. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

PINEDA, J.P., LUQUETTI, A., CASTRO, C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5, p.473-480, 1998.

PINTO DIAS, J.C. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.4, p.370-375, 2006.

POMPILIO M.A., DORVAL M.E., CUNHA R.V., BRITTO C., BORGES-PEREIRA J. Epidemiological, clinical and parasitological aspects of Chagas' disease in Mato Grosso

do Sul, State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.6, p.473-478, 2005.

POMPILIO, M.A., PANIAGO, A.M.M., BORGES-PEREIRA, J., SILVA, F.A.D., SILVA, R.C.B., LIMA, J.H.F. Análise clínica-epidemiológica de 200 casos de Doença de Chagas atendidos no HU-UFMS de 1986-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.214, 1998.

RANGEL-ALDAO, R.; COMACH, G.; ALLENDE, O.; CAYAMA, E.; DELGADO, V.; PIRAS, R.; PIRAS, M.; HENRIQUE, D.; NEGRI, S. *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epymastigotes and trypomastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.20, p.20-25, 1986.

RASSI, A., AMATO NETO, V., RASSI, G.G., AMATO, V.S. Busca retrospectiva da transmissão maternal da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.6, p.485-489, 2004.

REITHINGER, R., CEBALLOS, L., STARIOLO, R., DAVIES, C., GÜRTLER, R.E. Chagas disease control: deltamethrin-treated collar reduce *Triatoma infestans* feeding success on dog. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, p.502-508, 2005.

REY, L. Protozoários parasitos do homem. In: REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.115-339, 2001.

REYES, L.; SILESKY, E.; CERDAS, C.; CHINCHILLA, M.; GUERREIRO, O. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* em perros de Costa Rica. **Parasitology Latinoamerican**, v.57, p.66-68, 2002.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Evalution of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.2, p.197-203, 2005.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, M.C.; SÓPEZ-COLOMBO, A.; ORDÓÑEZ-TOQUERO, G.; GOMES-ALBINO, I.; RAMOS-JIMENEZ, J.; TORRES-RASGADO, E.; SALGADO-ROSA, H.; ROMERO-DÍAZ, M.; PULIDO-PÉREZ, P.; PÉREZ-FUENTES, R. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individual in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n. 7, p.733-739, 2006.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, M.D.C., BERNABÉ, C., TIBAYRENC, M., ZAVALA-CASTRO, J., TOTOLHUA, J.L., MÉNDEZ-LOPES, J., GONZÁLEZ-MEJÍA, M.E., TORRES-RASGADO, E., LÓPEZ-COLOMBO, A., PÉREZ-FUENTES, R. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in México and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.6, p.585-590, 2006a.

SHADOMY, S.V.; WARING, S.C.; CHAPPELL, C.L. Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canine in Texas. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n.2, p.313-319, 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M.A., MARCONDES, C.B., GUEDES, L.A., SIQUEIRA, G.S., BARONE, A.A., DIAS, J.C.P., AMATO NETO, V., TOLEZANO, J.E., PERES, B.A., ARRUDA JR., E.R., LOPES, M.A., SHIROMA, M., CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p.355-361, 1991.

SICILIANO, A.P.R.V.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SOUSA, A.S.; BRASIL, P.E.A.A.; HOLANDA, M.T.; GARCIA, M.Y.; XAVIER, S.S. Padrão de função diastólica e relação com a gravidade da forma clínica em 902 pacientes na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v.19, n.1, p.74-83, 2006.

SILVA, A.G.; SILVEIRA-LACERDA, E.P.; CUNHA-JUNIOR, J.P.; SOUZA, M.A.; JUNIOR, S.F. Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of

Trypanosoma cruzi excreted-secreted antigens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.6, p.454-459, 2004.

SILVA, L.S. **Prevalência de soropositivos para doença de Chagas em uma amostra da população de cães domiciliados da cidade de Porto Alegre**. Porto Alegre, RS. 2002, 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVA, R.P. **Estudo sobre *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909 em área de Mato Grosso do Sul: casos humanos, reservatórios e transmissores**. 1979. 83pp. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo.

SILVEIRA, C.A., VINHAES M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.15-60, 1998.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; SILVA, A.G.; JUNIOR. S.F.; SOUZA, M.A.; KESPER, N.; BOTELHO-FILHO, A.; UMEZAWA, E.S. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox Sanguinis**, v.87, p.204-207, 2004.

SOSA-JURADO, F., ZUMAQUERO-RIOS, J.L., CRUZ-GARCIA, A., GUZMÁN-BRACHO, C., MONTEÓN, V.M. Biotic and abiotic factors determining seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies against in Central Region of Mexico (Palmar de Bravo, Puebla, Mexico). **Salud Pública de México**, v.46, n.1, p.1-9, 2004.

TÁRRAGA, K.M.; CAMACHO, A.A.; DE CAROLI, A.; SPINOSA, H.S. Atropine's and propranolol's effect in chronic chagasic dogs: cardiac-respiratory's parameters and heart rate variability's evaluation. **ARS Veterinária**, v.18, n.1, p.13-19, 2002.

TEIXEIRA, A.R.L., MONTEIRO, P.S., REBELO, J.M., ARGANARAZ, E.R., VIEIRA, D., LAURIA-PIRES, L., NASCIMENTO, R., VEXENAT, C.A., SILVA, A.R., AULT, S.K., COSTA, J.M. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of

Trypanosoma cruzi from palm trees in the Amazon. **Emerging Infectious Disease**. v.7, n.1, p.100-112, 2001.

TEIXEIRA, A.R.L., NASCIMENTO, R.J., STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease-A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.463-491, 2006.

TILLEY, L. P.; BURTNICK, N.L. **ECG Eletrocardiografia para o Clínico de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca LTDA, 2004, 97p.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M.S.; STOLF, A.M. Enzyme –linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas’s disease. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.39, p.169-176, 2001.

UMEZAWA, E.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; STOLF, A.M.S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*T.cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. **Journal Clinical Laboratory Analysis**, v.10, p.407-413, 1996.

UMEZAWA, E.S.;SHIKANAI-YASUDA, M.A.; GRUBER, A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.1, p. 87-93, 1996a.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; KESPER Jr., N.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot assay using Excreted-Secreted antigen of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas’s disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.9, p.2143-2147, 1996b.

UMEZAWA, E.S.; SILVEIRA, J.F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.1, p.285-288, 1999.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **SECOND REPORT OF THE WHO EXPERT COMMITTEE**. Control of Chagas disease. Brasilia, 2002.

WILLIAMS, G.D.; ADAMS, G.; YAEGER, R.G.; McGRATH, R.K.; READ, W.K.; BILDERBACK, W.R. Natural occurring Trypanosomiasis (Chaga's disease) in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.171, n.2, p.171-177, 1977.

XAVIER, S.S.; SOUSA, A.S.; VIÑAS, P.A.; JUNQUEIRA, A.C.V.; BÓIA, M.N.; COURA, J.R. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínico, radiográfico do tórax, eletro e ecocardiográficos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.2, p.211-216, 2006.

YEO, M., ACOSTA, N., LLEWELLYN, M., SÁNCHEZ, H., ADAMSON, S., MILES, G.A.J., LÓPEZ, E., GONZÁLEZ, N., PATTERSON, J.S., GAUNT, M.W., ARIAS, A.R., MILES, M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.225-233, 2005.

ZABALGOITIA, M.; VENTURA, J.; ANDERSON, L.; CAREY, K.D.; WILLIAMS, J.T.; VANDEBERG, J.L. Morphologic and functional characterization of chagasic heart disease in non-human primates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.6, p.248-252, 2003.

ZANETTE, M.F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Araçatuba, SP. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

ZARATE-BLADES, C.R.; BLÁDES, N.; NASCIMENTO, M.S.; SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA, E.S. Diagnostic performance of tests base don *Trypanosoma cruzi*

excreted-secreted antigens in na endemic área for Chagas' disease in Bolívia.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.57, p.229-232, 2007.

Apêndice

APENDICE I - Certificação da Comissão de Ética e Bem Estar Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007148-07 do trabalho de pesquisa intitulado **“Infecção natural por *Trypanosoma Cruzi* em cães: estudo sorológico, clínico e eletrocardiográfico”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião extraordinária de 17 de abril de 2007.

Jaboticabal, 18 de abril de 2007.

Prof. Dr. Marcos Lânia de Araújo
Presidente - CEBEA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA