

Luciano José Eloy

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE HEMOCULTURA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR) UTILIZANDO OS INICIADORES P35/P36 E TCZ1/TCZ2 PARA A
DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM CÃES E GATOS**

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Botucatu, SP

2010

Luciano José Eloy

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE HEMOCULTURA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR) UTILIZANDO OS INICIADORES P35/P36 E TCZ1/TCZ2 PARA A
DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM CÃES E GATOS**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais
da Faculdade de Medicina de
Botucatu da Universidade Estadual
Paulista – UNESP/Botucatu.**

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Botucatu, SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Eloy, Luciano José.

Avaliação da técnica de Hemocultura pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2 para a detecção de *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos / Luciano José Eloy. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Simone Baldini Lucheis
Assunto CAPES: 40101096

1. Doença de Chagas - Botucatu (SP) 2. Doença de Chagas -
Campo Grande (MS) 3. Gato - Doenças 4. Cão - Doenças

Palavras-chave: Cães; Doença de Chagas; Gatos; Reação em Cadeia da Polimerase; *Trypanosoma cruzi*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sebastião (in memorian) e Dirce:

Dedico à vocês este trabalho, por todo apoio, dedicação, carinho e amizade, e pela luz e referência sempre presentes em minha vida. As palavras nunca serão suficientes para agradecer.

Amo vocês!

Aos meus irmãos Du, Léa e Sônia, com a certeza de que podemos sempre contar uns com os outros. A toda minha família que sempre se fez presente, mesmo que de longe, me apoiando e me dando forças para alcançar meus objetivos.

Obrigado a todos!

À minha namorada Lisi por todo amor, amizade, respeito e companheirismo que foram únicos e especiais em todo este projeto.

Te amo!

“Seja bom com os outros. A distância que você caminha na vida vai depender da sua ternura com os jovens, da sua compaixão com os idosos, sua compreensão com aqueles que lutam, da sua tolerância com os fracos e os fortes. Porque um dia você poderá ser um deles.”

George Washington Carver.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente à Deus por mais esta conquista, dando-me coragem, sabedoria e perseverança para continuar a luta.
- À minha orientadora Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, pela oportunidade da realização de mais uma passo importante em minha vida.
- À Dra. Sueli Calvi por sua solicitude e por sempre favorecer o bom andamento de meu projeto no Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu.
- À Profa. Dra. Ana Luíza Castro da Universidade Federal de Campo Grande (UFMS) por disponibilizar seu laboratório de Bacteriologia para o desenvolvimento de parte deste projeto.
- Aos Médicos Veterinários e funcionários do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande-MS pelo apoio e ajuda com os animais, e em especial à Diretora Júlia Maksoud Brazuna, por permitir a realização desta pesquisa.
- Aos Médicos Veterinários e funcionários do Canil Municipal de Botucatu-SP, por permitir a realização desta pesquisa, e pelo apoio e ajuda com os animais.
- À Associação de Proteção Animal de Botucatu (APA), em nome de Maria José e Maria Lúcia, por disponibilizar os gatos para a colheita de sangue e propiciar a realização deste projeto.
- À Lúcia, técnica do laboratório de Bacteriologia da UFMS, por sua colaboração e solicitude quanto ao uso desse laboratório.
- Ao Carlinhos, técnico do Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela ajuda prestada.
- Aos meus colegas Pós-Graduandos e Aprimorandos do Laboratório de Doenças Tropicais, em especial ao Thales, Talísia, Larissa, Vanessa, Eliana, Tatiane, Mariana, James e Daniela pela companhia, amizade, boa vontade e por sempre me ajudarem quando precisei. Muito obrigado!

- Aos colegas e funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, em especial à Virgínia, Rozi, Marcela, Patrícia, Tatiana, Benedito, Marcos, Wanderlei e Sérgio pela amizade e ajuda prestada.
- Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial à Regina, Andréa, Natanael e Lílian pela prontidão, amizade, disponibilidade, solicitude e apoio de sempre. Muito obrigado!
- À Mari Grots e Dona Vicentina por me receberem em sua casa em Campo Grande, possibilitando a realização de parte deste projeto. Muito obrigado pelo carinho, apoio e gentileza. Jamais esquecerei!
- Aos meus parceiros de república Du e Thales pela amizade e apoio. Valeu mesmo!
- À amiga Andreza, que esteve comigo desde o início deste projeto, me ajudando sempre com seu carinho e apoio. Obrigado pela grande amizade, confiança e companheirismo em momentos tão importantes!
- Ao amigo Ulisses, que tive a oportunidade de conhecer melhor durante o mestrado e ganhar um grande amigo. Obrigado parceiro pelo companheirismo!
- Ao amigo Nelson pela parceria de sempre, mesmo que de longe.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro prestado.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo fornecimento de auxílio à pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

DC – Doença de Chagas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

T. infestans – *Triatoma infestans*

T. brasiliensis – *Triatoma brasiliensis*

R. prolixus – *Rhodnius prolixus*

T. dimidiata – *Triatoma dimidiata*

T. sordida – *Triatoma sordida*

P. megistus – *Panstrongylus megistus*

R. neglectus – *Rhodnius neglectus*

mL – Mililitros

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

HAI – Hemaglutinação Indireta

LIT – Liver Infusion Tryptose

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

ELISA – Enzyme-Linked Imunosorbent Assay

kDNA – DNA de cinetoplasto

nDNA – DNA nuclear

pb – Pares de base

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

ALTA – Anticorpos anti-tripomastigotas vivos

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

APA – Associação de Proteção Animal

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

NUPEZO – Núcleo de Pesquisa em Zoonose

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

DNAases – Enzimas que clivam a molécula de DNA

RNAases – Enzimas que clivam a molécula de RNA

rpm – Rotações por minuto

µL – Microlitros

M – Molar

mM – Milimolar

Tris-HCl – Hidroximetil aminometano (amina primária) associada ao ácido clorídrico

MgCl² – Cloreto de magnésio

Taq-Polimerase – Enzima DNA taq-Polimerase

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

MIX-PCR – Mistura dos reagentes da PCR sem amostra de DNA

SPM – Sistema de Prevenção da Malária

HU-UFMS – Hospital Universitário da UFMS

HC-FMB - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

VPP – Valor Preditivo Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

RVP – Razão de Verossimilhança Positiva

RVN – Razão de Verossimilhança Negativa

OR – Odds Ratio

IC – Intervalo de confiança

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 - INTRODUÇÃO	3
2 - OBJETIVOS.....	16
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5- RESULTADOS.....	23
6 - DISCUSSÃO	37
7 - CONCLUSÕES	55
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9 - ANEXOS	70
10 - APÊNDICES	72
11 - ARTIGO	74

RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose, causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), afetando também espécies de animais silvestres e domésticos. Os cães e os gatos têm grande importância no ciclo de transmissão deste parasita, sendo considerados os principais reservatórios domésticos e fontes de infecção de tripanossomatídeos, devido a sua grande proximidade com o homem, sua boa susceptibilidade à infecção chagásica e por atraírem o vetor. Dentre os métodos diagnósticos, a hemocultura representa um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasita na corrente sanguínea. Esta é uma diferença importante em relação à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), considerada como padrão ouro, a qual possui capacidade de detectar fragmentos do parasita, não necessitando este estar presente inteiro na circulação. O presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de *T. cruzi* em cães e gatos procedentes de Botucatu-SP e Campo Grande-MS, bem como avaliar a técnica de hemocultura em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) utilizando-se a técnica de PCR, além de comparar os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2 na detecção do *T. cruzi* pela PCR. Foram colhidas aleatoriamente amostras de sangue de 50 cães e 50 gatos procedentes de Campo Grande-MS e de 50 cães e 50 gatos procedentes de Botucatu-SP. Para a hemocultura, cada amostra foi inoculada em três tubos, contendo 5 mL de meio LIT em cada. A primeira leitura das culturas foi após dez dias, sendo posteriormente observadas quinzenalmente, durante quatro meses. Ao término deste, todas as hemoculturas foram processadas para a extração do DNA parasitário. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2. Das 100 amostras de Botucatu-SP, dez cães e dez gatos (20%) foram positivos à PCR (tanto para os iniciadores P35/P36, quanto para os iniciadores TCZ1/TCZ2), quatro cães e três gatos (7%) positivos à hemocultura e um gato (1%) foi positivo às três técnicas. Dentre as amostras de Campo Grande-MS, todas obtiveram resultado negativo para ambas as técnicas. Os resultados demonstraram, que a técnica da PCR apresentou maior sensibilidade para o diagnóstico da doença de Chagas nos animais estudados, que os iniciadores TCZ1/TCZ2 confirmaram a positividade diagnóstica para *T. cruzi* demonstrada pelos iniciadores P35/P36 e que, no universo amostral estudado, os cães e gatos procedentes de Botucatu-SP estão exercendo papel de reservatórios domésticos desse parasita, o que demonstra a necessidade constante da vigilância epidemiológica para esta zoonose, bem como em Campo Grande-MS.

ABSTRACT

Chagas disease is a zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) which also affects household and wild animal species. Dogs and cats play an important role in this parasite's transmission cycle and they are considered to be the main household reservoirs as well as sources of infection with trypanosomatids due to their closeness to men, their good susceptibility to chagasic infection and the fact that they attract the vector. Among diagnostic methods, hemoculture represents a parasitological test whose positivity shows the parasite's presence in the blood stream. This is an important difference in relation to the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, which is regarded as gold standard and capable of detecting fragments of the parasite, thus not requiring the presence of whole organisms in the blood stream. The present study aimed at evaluating the occurrence of *T. cruzi* in dogs and cats from Botucatu - SP and Campo Grande - MS as well as at evaluating the technique of hemoculture in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium by using the PCR technique, in addition to comparing primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2 in the detection of *T. cruzi* by PCR. Blood samples were randomly collected from 50 dogs and 50 cats from Campo Grande - MS and from 50 dogs and 50 cats from Botucatu - SP. For hemoculture, each sample was inoculated into three tubes containing 5 mL of the LIT medium each. The first reading of the cultures occurred ten days later, and they were later observed fortnightly for four months. Upon completion of such period, all the hemocultures were processed for parasitic DNA extraction. The PCR reactions were performed by using primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2. Of the 100 samples from Botucatu - SP, ten dogs and ten cats (20%) were positive to PCR (both for primers P35/P36 and for primers TCZ1/TCZ2). Four dogs and three cats (7%) showed to be positive to hemoculture, and one cat (1%) was positive to the three techniques. As to the samples from Campo Grande - MS, all of them showed a negative result for both techniques. The results showed that the PCR technique presented higher sensitivity for diagnosing Chagas disease in the studied animals, that primers TCZ1/TCZ2 confirmed the diagnostic positivity for *T. cruzi* shown by primers P35/P36 and that, in the studied samples, the dogs and cats from Botucatu - SP are playing the role of household reservoirs of this parasite, which shows the constant need for epidemiological surveillance for this zoonosis not only in Botucatu - SP, but also in Campo Grande - MS.

1 – INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), também denominada de tripanossomíase americana, é uma antropozoonose latino-americana importante, sendo seu agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), pertencente ao subfilo *Mastigophora*, do filo *Sarcomastigophora*, classe *Kinetoplastidae* e ordem *Kinetoplastida*. Nesse grupo, encontram-se flagelados com uma organela conhecida por cinetoplasto, a qual corresponde a uma condensação do DNA localizado no interior de mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (1).

A DC dispersa-se, praticamente, do México à Patagônia, infectando entre 16 e 18 milhões de indivíduos, com padrões diversos de morbi-mortalidade, em diferentes países ou regiões, e 100 milhões vivendo em área de risco (1, 2, 3, 4).

No Brasil, a infecção se espalha em 3,5 milhões de quilômetros quadrados, abrangendo os estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país (5). Estima-se que haja seis milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*, além de 25 milhões de pessoas viverem em áreas de risco e que, a cada ano, surjam 33 mil novos casos da doença. A maior incidência está no norte do país, onde 0,4% da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, e parte dos estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, é dada como contaminada (6, 7).

Em Inquérito Sorológico Nacional sobre a DC, realizado no período de 1975-1980, estimou-se em 2,5% a soroprevalência para todo o estado de Mato Grosso do Sul, sendo encontrado 1,83% de soropositivos entre 14.709 moradores investigados no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, na área urbana de 12 municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde-MS (8, 9).

Em estudo realizado no estado de São Paulo entre 1977 a 1986, foi relatada a ocorrência média de 1.537 óbitos anuais nos quais a doença foi identificada como causa

básica, sendo que a participação da tripanossomíase americana na mortalidade proporcional foi da ordem de 0,9% (10).

Primitivamente, a DC era considerada uma enzootia, pois afetava exclusivamente mamíferos silvestres e aves, sendo transmitida por triatomíneos (vetores) de hábitos silvestres. Recentemente, essa doença se tornou urbana devido ao aumento da emigração rural, além do aumento no número de transfusões sanguíneas (2). Devido ao desequilíbrio ecológico, esses vetores passaram a invadir os abrigos dos animais domésticos e as habitações humanas, adaptando-se progressivamente a esses ecótopos artificiais. Assim, o *T. cruzi* passou a infectar o homem e os animais domésticos susceptíveis, como o cão e o gato, tornando a DC uma típica zoonose (11, 12).

Os cães e gatos infectados com *T. cruzi* atuam como fontes de infecção para o homem e outros animais, sendo importantes reservatórios de tripanossomatídeos dentre os animais domésticos, devido a sua maior proximidade com o homem e sua susceptibilidade à infecção chagásica (2, 13, 14). Evidências demonstram que o cão possui maior participação na transmissão doméstica da doença, porém, o papel epidemiológico dos felinos ainda não foi estudado intensamente e permanece controverso (13). Assim, a presença desses parasitas em cães e gatos representa um sinal de alerta para ações efetivas de controle de vetores, no caso os triatomíneos, vulgarmente conhecidos por “barbeiros” (2, 13, 14).

O parasitismo humano se instalou devido à proliferação de certas espécies de triatomíneos nos ecótopos artificiais, permitindo que o ciclo domiciliar e peridomiciliar da infecção assumissem extraordinária importância. A presença de cães ou gatos infectados no ambiente domiciliar ou peridomiciliar está significativamente associada à prevalência e incidência de *T. cruzi* no homem. Nos países do cone Sul, onde o *Triatoma infestans* (*T. infestans*) é o principal vetor, o cão e o gato possuem prevalência na faixa de 8-50% para o *T. cruzi*, que frequentemente excede os valores encontrados no homem (2). Souza *et al.* (7),

em 2008, relataram que, em áreas onde o *T. infestans* é o principal vetor domiciliar, as taxas de infecção de *T. cruzi* em cães e gatos são maiores que no homem.

Deve-se ressaltar a importância dos reservatórios silvestres (gambá, rato, ouriço, preguiça, tamanduá, morcego, cachorro-do-mato, coelho, macaco, dentre outros) no ciclo de transmissão da doença, tendo em vista que, devido às mudanças no meio ambiente, aproximaram-se das moradias humanas e adaptaram-se a esses novos ecótopos (12).

A transmissão da infecção por triatomíneos ocorria predominantemente nas áreas rurais de baixa densidade populacional. Contudo, com a intensidade dos movimentos migratórios internos ligados à dinâmica econômica, a endemia, que era rural, foi se transformando em urbano-rural, já que os ciclos domiciliar e peridomiciliar da doença foram criados devido à adaptação e proliferação de certas espécies de triatomíneos nos ecótopos artificiais. Esse fenômeno foi favorecido pela migração de pessoas para as regiões peri-urbanas (12, 15).

Há indicadores de que esse problema tende a se agravar, pois, além do processo migratório ser contínuo, a interação de *T. cruzi*, vetor e reservatório pode, teoricamente, influenciar o curso da doença humana, pois, em passagem por diferentes organismos, o parasita sofre processos de seleção e adaptação, que podem resultar em cepas de maior ou menor patogenicidade para o ser humano (15, 16).

A importância da infecção natural canina pelo *T. cruzi*, acentuada a princípio por Carlos Chagas (1909), foi constatada *a posteriori*, sendo o cão considerado reservatório natural importante de tripanossomatídeos na maioria dos países latino-americanos e em algumas áreas dos Estados Unidos da América (2, 17, 18).

As taxas de infecção natural nos cães variam muito conforme a situação epidemiológica local, sendo geralmente altas quando estão elevados os índices triatomínico-tripanossômicos de uma unidade domiciliar ou localidade. Inquéritos de campo, feitos por meio de xenodiagnóstico por toda a América Latina, têm mostrado grandes variações na

infecção natural de cães e também de gatos, com extremos de 3% a 60%, e maiores concentrações entre 8% e 28% (19).

Em 1920, Tejera (20) identificou, no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*), na Venezuela, formas evolutivas de um tripanossomatídeo diferentes daquelas do *T. cruzi*, denominando esse novo parasita de *Trypanossoma rangeli* (*T. rangeli*).

O *T. rangeli* pode infectar várias espécies de mamíferos, inclusive o homem da América Central e do Sul, sobrepondo sua distribuição à do *T. cruzi*, abordando também vetores triatomíneos, principalmente do gênero *Rhodnius* (21). Infecções naturais pelo *T. rangeli* foram relatadas na Venezuela, Colômbia e Paraguai, em cães e gambás, bem como em animais experimentalmente infectados, tais como camundongos e ratos (22). Diferentemente do *T. cruzi*, esse tripanossoma é considerado patogênico apenas para os insetos triatomíneos, sendo inofensivo para os hospedeiros vertebrados como o homem e o cão (23).

No Brasil, foi detectada a presença de *T. cruzi* e *T. rangeli* em cães naturalmente infectados (18, 24, 25). A presença simultânea desses parasitas na mesma região geográfica permite a infecção mista em hospedeiros vertebrados e invertebrados (24).

Gurtler (13), em 2007, afirmou que cães, seres humanos e aves normalmente são as fontes domésticas mais importantes para *T. infestans* e outros triatomíneos, enquanto, Rosypal *et al*, em 2007, citaram que gambás e ratos desempenham o principal papel no ciclo silvestre de transmissão do parasita.

Há mais de cem espécies vetoras responsáveis pela transmissão natural do *T. cruzi*, interferindo diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia chagásica. Dentre as principais espécies vetoras em potencial para o *T. cruzi*, seis têm importância epidemiológica na América do Sul: *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis* (*T. brasiliensis*), *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*), *Triatoma sordida* (*T. sordida*), *Panstrongylus megistus* (*P. megistus*) e *R. prolixus*. Dentre elas, a mais importante, devido ao

seu hábito quase que estritamente doméstico e também com a mais extensa área de distribuição, é o *T. infestans*, encontrado na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai (15).

O *P. megistus* é a segunda espécie mais importante, sendo domiciliada em algumas regiões, peridomiciliar e silvestre em outras. Também tem vasta distribuição geográfica, distribuindo-se desde as Guianas até a Argentina. As espécies presentes no estado de São Paulo são consideradas predominantemente peridomiciliares. Destacam-se, entre elas, *T. sordida* e *Rhodnius neglectus* (*R. neglectus*), dispersos na região do planalto, incluindo as regiões de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Araçatuba; *P. megistus*, encontrado nas regiões do Vale do Ribeira, Sorocaba, Campinas e em municípios da região de Ribeirão Preto, que fazem divisa com o estado de Minas Gerais e o *Triatoma tibiamaculata*, encontrado na região do Vale do Ribeira (12).

As ações sistemáticas de combate aos vetores da DC, com o emprego de inseticidas nos domicílios da zona rural paulista, iniciadas em 1950, lograram êxito no sentido de interromper a transmissão natural da enfermidade, causada pelo *T. infestans*, já na década de 70. Como consequência do controle instituído no final dos anos sessenta, esta espécie começou a desaparecer das áreas trabalhadas, não ocorrendo o mesmo com *T. sordida* e *P. megistus* (26). Com a virtual eliminação do *T. infestans*, o serviço de controle passou a desenvolver uma estratégia de vigilância sobre as espécies secundárias (27). *T. sordida* e *P. megistus* não apresentam a mesma susceptibilidade do *T. infestans* aos inseticidas normalmente utilizados no controle, podendo-se manter apenas os níveis de infestação teoricamente incompatíveis com a transmissão. Esta situação tem sido motivo de preocupação por parte da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), diante da perspectiva de que o vazio ecológico determinado pela eliminação do *T. infestans* fosse ocupado por esses vetores (28). Estudos sobre dinâmica populacional desses artrópodes no intradomicílio e peridomicílio, ou pelo emprego de galinheiros experimentais, mostraram que

essas espécies podem reinfestar áreas já controladas e manter a circulação do *T. cruzi* nesses ambientes (29).

Os triatomíneos são estritamente hematófagos, alimentando-se do sangue de hospedeiros vertebrados, ou seja, a presença de insetos infectados depende da presença também de vertebrados infectados. Os vetores, em qualquer estágio de sua vida, infectam-se ao ingerirem as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado infectado, durante o hematofagismo. Essas mesmas formas, que se multiplicam no intestino do "barbeiro", são eliminadas em suas fezes ou urina, durante ou logo após o repasto sangüíneo (16, 17, 19, 30). A transmissão, tanto do *T. cruzi* como do *T. rangeli*, se dá pelas fezes e/ou urina que o "barbeiro" deposita sobre a pele da pessoa, enquanto suga o sangue. Geralmente, a picada provoca coceira e o ato de coçar facilita a penetração do parasita pelo local da picada, sob a forma de tripomastigota metacíclico. (12, 15, 23, 31, 32). O *T. cruzi* contido nas fezes e urina do "barbeiro" pode penetrar no organismo humano, também pela mucosa dos olhos, nariz e boca ou por feridas ou cortes recentes existentes na pele. (12, 15, 31, 32).

Há ainda, outros mecanismos de transmissão, tais como transfusão de sangue, caso o doador seja portador da doença; transmissão congênita; transplante de órgãos e tecidos de pacientes infectados; via oral (ingestão de carne contaminada, ou alimentos contaminados com fezes de triatomíneos e/ou de animais silvestres); aleitamento materno; e, ainda, acidentalmente em laboratórios (12, 15, 31, 32).

Entre os reservatórios silvestres e domésticos, a infecção por via oral, a partir da ingestão de insetos ou predação de animais infectados, representa outra forma de transmissão (33).

Diversos autores também citam a transmissão por ectoparasitas, tanto natural quanto experimentalmente. Argañaraz *et al.* (34), em 2002, sugeriram que piolhos hematófagos podem disseminar a infecção pelo *T. cruzi* em babuínos, utilizando a PCR como teste

diagnóstico. Já Neiva (35), em 1913, relatou ter isolado *T. cruzi* em carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) ingurgitados sobre cães. Alcântara (36), em 1966, em trabalho experimental, relata que mosquitos da espécie *Culex fatigans* foram capazes de reter a infecção por até três dias no tubo digestivo, ao sugar camundongos em fase aguda.

No homem e nos animais domésticos e silvestres, o *T. cruzi* se apresenta em duas formas evolutivas diferentes: hemática (tripomastigota) e celular (amastigota), vivendo no sangue periférico e nas fibras musculares, especialmente as cardíacas e digestivas. No inseto transmissor, vive no tubo digestivo (4, 37).

As características clínicas da DC no homem foram descritas em 1910 por Carlos Chagas, que também estabeleceu, como diagnóstico, a detecção do parasita no sangue periférico (38). Chagas caracterizou a doença em duas fases, aguda e crônica, de acordo com a alta ou baixa intensidade de elementos mórbidos e sua persistência nos indivíduos infectados (39).

A fase aguda inicia-se logo após a penetração e incubação do parasita na corrente sanguínea, a qual leva o *T. cruzi* para quase todos os órgãos e tecidos do organismo. O chagoma de inoculação e o sinal de Romanã, ou complexo oftalmolinfonodal, são essenciais para o diagnóstico, por indicar a porta de entrada dos parasitas. Os sinais e sintomas frequentemente apresentados nessa fase da doença são febre, mal estar, mialgia, cefaléia, astenia, anorexia, podendo o paciente manifestar distúrbios cardíacos, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, linfocitose e, excepcionalmente, lesões no sistema nervoso autônomo. Em crianças, o quadro pode se agravar e levar à morte. A fase aguda também pode passar despercebida, sendo assintomática, ou com poucos sinais clínicos, como febrícula e taquicardia. Dura cerca de 3 a 8 semanas e o paciente evolui para a fase crônica (37, 40).

Os pacientes, em fase crônica, podem passar um longo período, ou mesmo toda a sua vida, sem apresentar manifestação alguma da doença, embora sejam portadores do

T. cruzi, sendo essa fase denominada crônica indeterminada, caracterizada apenas por sorologia positiva e eletrocardiograma e radiografias do coração, esôfago e cólon normais (37, 38, 40). Estima-se que aproximadamente 50% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* apresentem a forma crônica indeterminada da doença (41). Em outros casos, a doença progride ativamente, passada a fase inicial, evoluindo para a forma cardíaca e/ou digestiva, comprometendo o coração (cardiomegalia), o aparelho gastrointestinal (megacólon, megaesôfago, ou forma mista), além de danos neurológicos eventualmente (37). O indivíduo com a forma cardíaca pode ou não apresentar sintomas, tais como alterações eletrocardiográficas e eventualmente miocardiopatia e arritmia (40).

Causadora de mortes precoces em populações adultas, a DC também gera perdas na produtividade por absenteísmo, além de apresentar custo médico-social elevado em termos de tratamento, internações hospitalares, cirurgias corretivas, aplicação de marcapassos, etc (3).

O controle da doença baseia-se principalmente em medidas de contenção do vetor, impedindo a sua proliferação nas moradias e em seus arredores, e triagem de sangue nos serviços de hemoterapia. Além de medidas específicas (inquéritos sorológicos, entomológicos e desinsetização), as atividades de educação em saúde devem estar inseridas em todas as ações de controle (12, 42). É fundamental destacar, ainda, como medida de controle da DC, o conhecimento da ocorrência e distribuição das fontes de infecção e dos vetores.

Devido ao avanço do conhecimento, em relação ao manejo da cardiopatia chagásica, e aos resultados obtidos pelo Programa de Controle da doença de Chagas, incluiu-se essa doença no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (Portaria do MS nº 1.100 de 23 de maio de 1996), respeitando-se as características clínicas e epidemiológicas, que lhe são próprias e que impõem métodos e técnicas diferenciadas de vigilância. Quanto à notificação,

apenas os casos agudos são referidos à equipe de vigilância mais próxima do local de ocorrência da transmissão, e os casos crônicos não são de notificação compulsória (43).

Em áreas endêmicas, onde há reservatórios silvestres de tripanossomatídeos, ressalta-se a possibilidade de infecção dentro do ciclo peridomiciliar e domiciliar, devendo-se realizar a busca periódica de triatomíneos e a captura de animais sinantrópicos, como gambás e roedores (44).

No estado de São Paulo, a vigilância entomológica da doença de Chagas, realizada pela SUCEN, tem concentrado atenção às espécies secundárias silvestres de triatomíneos que resultam ser as mais capturadas: *T. sordida*, *P. megistus* e *R. neglectus* (45). Desta forma, preconiza-se a busca ativa de triatomíneos em áreas de infestação residual e o estímulo à notificação desses insetos por parte da população, com cobertura em todo estado (46).

Lorosa *et al.* (47), em 2003, estudando a determinação das fontes alimentares e da infecção natural do *Triatoma jurbergi* e *Triatoma vandai*, capturados no estado do Mato Grosso do Sul, verificaram que essas espécies silvestres vêm invadindo o domicílio nesse estado, tornando-os de interesse na epidemiologia da DC, tendo-se encontrado tripanossomas no intestino desses insetos, cujas fontes alimentares eram provenientes de várias espécies animais, entre elas, o cão.

Luheis *et al.* (18), em 2005, estudaram um total de 50 cães, sendo 26 machos e 24 fêmeas, com idades variando de dois meses a 15 anos, pertencentes a 30 indivíduos chagásicos crônicos, na região Oeste do estado de São Paulo, compreendendo 15 municípios. Nesses animais, foi realizado o xenodiagnóstico artificial, hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *T. cruzi* e/ou *T. rangeli*. Um total de 43 cães (86%) foi reagente a pelo menos um dos testes realizados, sendo 34 (68%) ao xenodiagnóstico, 30 (60%) à hemocultura e 25 (50%) à PCR. Ainda que não tenham sido encontrados triatomíneos no intra e no peridomicílio durante as inspeções das residências, os resultados

obtidos demonstraram a possibilidade de uma cadeia de transmissão de tripanossomas para os cães pesquisados, determinando, portanto, que novos estudos devam ser realizados, já que os cães, assim como os gatos, poderão se infectar e exercer o papel de reservatórios de tripanossomatídeos.

Quanto aos métodos diagnósticos para a doença de Chagas, a hemocultura representa um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasita na corrente sanguínea, o qual é visualizado ao microscópio óptico. Essa é uma diferença importante em relação à técnica de PCR, a qual tem capacidade de detectar fragmentos do parasita, que não necessita estar presente inteiro na circulação (18).

Quando se identifica hemocultura positiva, é desejável obter lâmina corada, o que se torna difícil, devido à necessidade da presença de parasitas em quantidade suficiente para sua visualização. Estudos confirmam que a hemocultura é sensível para o diagnóstico da DC, sendo que pode haver resultados persistentemente negativos, mesmo que a sorologia convencional mostre sempre resultado positivo (48). Sua sensibilidade aumenta quando o volume e o número de amostras são maiores, o tempo entre a coleta e o processamento é menor e quando se utiliza o meio LIT (Liver Infusion Tryptose) para cultivo (49).

A infecção por *T. rangeli* induz resposta imune humoral no homem que reage com *T. cruzi*. Sua ampla distribuição, que permite a ocorrência de infecções únicas e/ou mistas, tanto em hospedeiros vertebrados quanto em invertebrados, aliada à reatividade cruzada em ensaios sorológicos, é de grande importância no diagnóstico da doença de Chagas (50).

Apesar de a detecção de infecções por *T. cruzi* e *T. rangeli* ser baseada nos mesmos ensaios sorológicos e parasitológicos, tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio Imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), hemocultura e xenodiagnóstico, nenhum desses métodos pode detectar especificamente esses tripanossomas (51).

Alguns autores têm usado ensaios moleculares, para esse fim, em hospedeiros vertebrados e invertebrados, utilizando diferentes métodos de extração de DNA (52). Alguns procedimentos moleculares têm sido utilizados com o propósito de identificar e classificar diferentes tripanossomas. Nesse amplo grupo de protozoários, uma das estruturas mais estudadas tem sido o cinetoplasto, constituído por região rica em DNA, contido em uma mitocôndria (kDNA), situada na base do flagelo, presente em todos os flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, incluindo-se o *T. cruzi* e o *T. rangeli* (53). O kDNA representa cerca de 25% de todo o DNA do flagelado. Estruturalmente, esse DNA é formado por uma rede de moléculas interligadas, de conformação circular de dois tamanhos, designados de maxicírculos e minicírculos (54, 53). As moléculas de minicírculos de kDNA, entre as espécies de tripanossomas, são heterogêneas em relação à sequência de nucleotídeos, fazendo com que seja possível a distinção entre as espécies pela análise molecular desse componente. Por outro lado, tem sido demonstrada, dentro da mesma espécie, a existência de regiões heterogêneas, intercaladas a regiões altamente homogêneas quanto à seqüência, ao arranjo e à posição dos nucleotídeos nas moléculas (55, 56, 53).

Para o *T. cruzi*, a amplificação da região variável do minicírculo de kDNA, com o uso dos iniciadores P35/P36, produz a banda característica de 330 pares de base (pb) e permite a detecção do equivalente de um milésimo de uma única célula do parasita (56, 57).

Porém, o kDNA do *T. rangeli* pode ser amplificado com os mesmos pares de iniciadores utilizados para o kDNA do *T. cruzi*, produzindo um produto de 760 pb e bandas adicionais variando de 300 a 450 pb. Isso é possível devido à igualdade na sequência de bases nitrogenadas de sítios específicos de anelamento dos iniciadores, comuns ao *T. cruzi* e *T. rangeli* (**Figura 1**). A igualdade de tamanho dos fragmentos dos dois tripanossomas dificulta o uso dessa aproximação na análise de infecções únicas e mistas (52).

		CSB-1		CSB-2	
T.C 001	atTtcGGAAAtTtTGGTTTTGGG	<u>AGGGCGTTC</u>	AACTTTTGGGGCGaAAATTCATGCATCTC	<u>CCCCGTAC</u>	070
T.R 001	TgTcAGAAAAaTtGGTTTTGGG	<u>AGGGCGTTC</u>	AAGATTGGGGgTCagAATTCATGCATCTC	<u>CCCCGTAC</u>	070
			S35: 3'-	AGTACGTAGAGGGGCATG	
				CSB-3	
T.C 071	ATTATTTtGgCcAAAAAtggGgaTTTTTcacGGGAGGTGGGGTTCGATT	<u>GGGGTTGGTGT</u>	ATATATAG	0136	
T.R 071	ATTATTTtgCTataAAaTgGTgTTTTTTCAGGGAgGTGGAGTTCGATT	<u>GGGGTTGGTGT</u>	ATATATAG	0136	
	TAATAAA-5'		S36: 5'-	GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	

Figura 1: Alinhamento das seqüências similares ao *T. cruzi* (GenBank accessions M18814-M18816, M19174-M19181, M19185-M19192) e *T. rangeli* (GenBank accessions L19338-L19395, L28038-L28039) em fragmentos de minicírculos de regiões de kDNA dos parasitas. São exibidas três seqüências similares (CSB-1, CSB-2 e CSB-3) em negrito, itálico e sublinhado. As seqüências e os sítios de anelamento dos iniciadores P35 e P36 são mostrados abaixo das seqüências similares (52).

Virreira *et al.* (58), em 2003, em um estudo com amostras de sangue de recém-nascidos de mães infectadas com *T. cruzi*, em Cochabamba, na Bolívia, testaram vários pares de iniciadores os quais, de acordo com alguns autores, amplificariam o DNA do parasita. Concluiu-se que a sensibilidade do par de iniciadores TCZ1/TCZ2 (que apresenta fragmentos de 188 pb) é 10 vezes maior que do par P35 e P36 (59). A sensibilidade do protocolo usado na PCR desse estudo foi suficiente para detectar um parasita em um volume de 0,1 mL de sangue, sendo seu limiar de detecção de 0,002 parasitas por ensaio de PCR (60, 61). Além disso, os iniciadores TCZ1/TCZ2 têm capacidade de amplificar todas as linhagens de *T. cruzi* (60, 61, 62), e de não amplificar o DNA de outro tripanossoma (60, 61).

Os iniciadores TCZ1/TCZ2 amplificam uma seqüência repetitiva de uma região de microsatélite do DNA nuclear (nDNA) do *T. cruzi* (60). Essa região é o gene do mini-exon, que apresenta uma localização nuclear e é constituído por três regiões distintas: exon, intron e intergênica. O exon é altamente conservado mesmo entre diferentes espécies, sendo

adicionado transcricionalmente em todos os mRNA nucleares. O intron apresenta maior variabilidade tanto em tamanho como em sequência, sendo relativamente conservado entre as espécies de um mesmo gênero, apresentando tamanhos e sequências nucleotídicas distintas mesmo entre espécies muito próximas. (63, 64).

Comparando-se dois pares de iniciadores para *T. cruzi* capazes de amplificar seqüências de DNA de 188 pb e 330 pb, Kirchhoff *et al.* (59), em 1996, encontraram melhor sensibilidade dos iniciadores de 188 pb, ao analisar sangue de camundongos infectados com tripomastigotas da cepa Tulahuén, após 380 dias de infecção (49).

A comparação da PCR com os métodos parasitológicos e sorológicos para o diagnóstico de *T. cruzi* em cães, após cinco a doze anos de infecção experimental, demonstrou 100% de positividade, detectando a presença do DNA do parasita em todos os cães infectados. A habilidade dos métodos parasitológicos em identificar um animal positivo foi de 22% e 11% por hemocultura e xenodiagnóstico, respectivamente. Por outro lado, os testes sorológicos convencionais e também o teste de anticorpos anti-tripomastigotas vivos (ALTA) foram positivos em todos os cães infectados. Concluiu-se que a utilização de técnica sorológica ou parasitológica em conjunto com a técnica de PCR resulta em excelente método diagnóstico para a detecção da DC em cães (65).

Com base nos aspectos apresentados, pretendeu-se estudar a ocorrência de *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos provenientes dos municípios de Botucatu-SP e de Campo Grande-MS, bem como propor um método diagnóstico seguro em cães e gatos, associando-se à hemocultura a técnica de PCR para *T. cruzi*, a partir das culturas de sangue desses animais, tidos como importantes reservatórios de tripanossomatídeos e avaliando-se a eficiência diagnóstica dos pares de iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2. Com isso, identificam-se os animais realmente infectados, e avalia-se a importância da espécie felina como reservatório para a doença.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

1. Avaliar a ocorrência do *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos procedentes de Botucatu-SP e Campo Grande-MS.

2.2 – Objetivos Específicos:

1. Avaliar a ocorrência de infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos com a utilização das técnicas de hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2. Avaliar a técnica de hemocultura em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) pela utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi*.

3. Comparar os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2 na detecção do *Trypanosoma cruzi* na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

Foram estudados 200 animais, sendo 100 animais procedentes de Botucatu-SP (50 cães e 50 gatos) e 100 animais procedentes de Campo Grande-MS (50 cães e 50 gatos).

3.2 - Amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas de 50 cães e de 50 gatos escolhidos aleatoriamente, no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande-MS e de 50 cães e de 50 gatos, no Canil Municipal e na Associação de Proteção Animal (APA) de Botucatu-SP. As amostras foram armazenadas imediatamente após a colheita, em caixas de isopor, mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, para a realização das hemoculturas.

3.3 – Colheita de sangue

Foram colhidos, de cada animal, 5 mL a 8 mL de sangue, por punção veno-jugular, utilizando-se tubos contendo EDTA, e mantidos em condições adequadas de refrigeração até a chegada ao laboratório, onde foram imediatamente processados para a hemocultura.

3.4 – Processamento das amostras e realização da técnica de hemocultura

O processamento das amostras colhidas dos animais do Canil Municipal e da APA de Botucatu-SP e, posteriormente, a realização da técnica de hemocultura ocorreram no Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde

Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu-SP. Para as colheitas relativas aos animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande-MS, as amostras para hemocultura foram processadas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS e a técnica de hemocultura foi realizada no Laboratório de Doenças Tropicais, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, campus de Botucatu-SP.

3.5 – Hemocultura em meio LIT

O meio de cultura utilizado para o cultivo das amostras de sangue foi o Liver Infusion Tryptose (LIT) – (**Anexo 1**).

Para cada amostra de sangue colhida, foram separados três tubos rosqueados estéreis contendo, cada um, cinco mL de meio LIT estéril. A manipulação das amostras de sangue foi feita em capela de fluxo laminar, limpa previamente com álcool 70° e mantida sob a ação de luz ultravioleta, por 20 minutos. Com uma seringa estéril de 1 mL, foi retirada a porção plasmática, lentamente transferida para o primeiro tubo. Esse procedimento foi repetido para a porção leucocitária (localizada entre o plasma e o sedimento de hemácias), a qual foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o terceiro tubo. Em seguida, as culturas foram incubadas e mantidas em estufa sob temperatura de 28°C – 30°C, até quatro meses após a inoculação, quando então foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *T. cruzi* e/ou *T. rangeli*.

3.6 – Leitura das hemoculturas

Em capela de fluxo laminar, após dez dias da inoculação da amostra, foi realizada a primeira leitura, retirando-se cinco microlitros de cada tubo de cultura inoculado, colocando-

se entre lâmina e lamínula, fazendo-se a leitura de cinco lâminas por tubo. A observação foi realizada em microscópio óptico no aumento de 1.000X, com óleo de imersão. As culturas foram observadas quinzenalmente, durante quatro meses. As culturas positivas foram imediatamente processadas para a extração do DNA parasitário, assim como as culturas negativas, após o término dos quatro meses de acompanhamento das leituras.

3.7 – Preparo das amostras de sangue em meio LIT para a extração do DNA parasitário

Tanto as culturas positivas, quanto as negativas, foram lavadas, separadamente, em Solução Salina Tamponada (PBS) estéril, 0,01M (pH 7,2) e centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos, e o sedimento armazenado em microtubos estéreis livres de DNAses e RNAses a -20°C, até o momento do uso para extração do DNA parasitário (49).

3.8 – Extração do DNA

O DNA foi extraído de 300 µL do sedimento armazenado, utilizando-se o Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), sendo posteriormente armazenado em microtubos estéreis livres de DNAses e RNAses e mantido a -20°C até a realização da PCR.

3.9 - Reação em Cadeia da Polimerase para *Trypanosoma cruzi* e/ou *Trypanosoma rangeli*

As reações, referentes às amostras dos animais de Botucatu-SP e Campo Grande-MS, foram realizadas em duplicata, contendo 2,5 µL de tampão de PCR (50mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,0 U de Taq-polimerase, 10 pmol de cada iniciador, 2 µL de DNA e 17,8 µL de água ultra pura, para um volume final de 25 µL.

Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA de 330pb, foram utilizados os iniciadores P35/P36, segundo Sturm *et al.* (56), 1989.

P35: 5' – AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA - 3'

P36: 5' - GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT - 3'

As condições de amplificação em termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf®) ocorreram de acordo com Vallejo *et al.* (52), 1999, sendo um ciclo para denaturação inicial a 96°C por 2 minutos; denaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 30 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C, respectivamente; e um ciclo de 72°C por dez minutos para a extensão final.

3.10 - Reação em Cadeia da Polimerase para diferenciar *Trypanosoma cruzi* de *Trypanosoma rangeli*

Tendo em vista que os iniciadores utilizados na PCR, P35/P36, não são específicos para *T. cruzi*, amplificando minicírculos de kDNA tanto desse tripanossomatídeo como também do *T. rangeli* (53), foram usados, para confirmação diagnóstica, os iniciadores TCZ1/TCZ2, espécie-específicos para *T. cruzi*, amplificando uma região de microssatélite de nDNA de 188 pares de base (58,60).

TCZ1: 5' – CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT - 3'

TCZ2: 5' - CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'

As reações foram realizadas em duplicata, contendo 2,5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,0 U de *Taq*-polimerase, 10 pmol de cada iniciador, 2 µL de DNA e 17,8 µL de água ultra pura, para um volume final de 25 µL.

As condições de amplificação em termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf®) ocorreram de acordo com Virreira *et al.* (58), 2003, sendo um ciclo para denaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos para denaturação a 94°C por 20 segundos; anexação dos iniciadores a 57°C por 10 segundos e alongamento a 72°C por 30 segundos e um ciclo de 72°C por sete minutos para a extensão final.

As alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas, com a utilização dos iniciadores P35/P36, bem como TCZ1/TCZ2, foram homogeneizadas com 2 µL de solução de azul de bromofenol e, para a identificação dos produtos amplificados, submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 10X, corado com Gelred™ (Biotium, Inc.®). A corrida foi realizada, utilizando o mesmo tampão TBE, a 80 voltz por 100 minutos, sendo as bandas visualizadas em transluminador ultravioleta (Benchtop M-20 - UVP®). A cuba de eletroforese utilizado foi da marca Uniscience®.

A cepa Y do *T. cruzi* foi utilizada como controle positivo, o MIX-PCR como controle negativo e foi utilizado 3 µL de DNA Ladder (NORGEN®) 100 pb como padrão de peso molecular.

3.11 – Comissão de Ética em Experimentação Animal

Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, tendo sido aprovado segundo parecer emitido em 28 de junho de 2.007 (**Anexo 2**).

4 – Análise Estatística

Considerou-se a PCR como padrão ouro e foram obtidos os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e razão de verossimilhança negativa (RVN), em relação à hemocultura para detectar o *T. cruzi*.

A verificação de concordância entre os diagnósticos positivos e negativos da PCR e da hemocultura foi feita pelo cálculo do coeficiente Kappa.

Para a diferença entre as duas técnicas, foi realizado um Modelo de Regressão Logística, considerando o diagnóstico positivo como variável resposta e as técnicas (PCR e hemocultura) como variáveis explanatórias.

Em todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa SAS for Windows, versão 9.1.3.

5 – RESULTADOS

Dentre os cães, 51 eram machos (28 de Campo Grande-MS e 23 de Botucatu-SP) e 49 eram fêmeas (22 de Campo Grande-MS e 27 de Botucatu-SP).

Em relação aos gatos, 50 eram machos (32 de Campo Grande-MS e 18 de Botucatu-SP) e 50 eram fêmeas (32 de Botucatu-SP e 18 de Campo Grande-MS).

Não foi possível determinar-se a procedência e a idade dos animais de cada município. Os animais não foram submetidos a exame clínico.

5.1 – Animais de Botucatu

5.1.1 - Hemocultura

Dos 50 cães, quatro amostras (8%) apresentaram parasitas viáveis na cultura e, das 50 amostras de gatos, em três (6%) observaram-se formas parasitárias (**Gráfico 1 / Figura 2**).

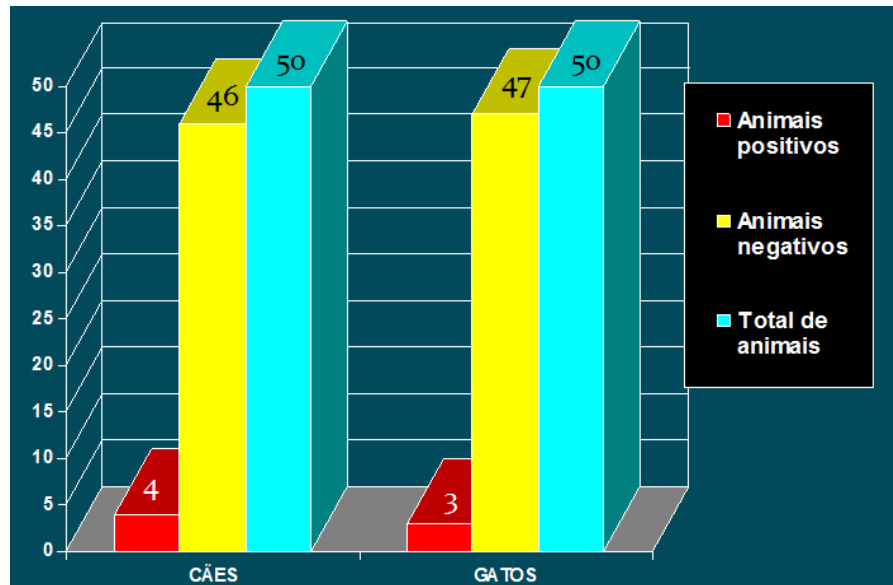


Gráfico 1: Hemoculturas positivas para tripanossomatídeo avaliadas em 50 cães e 50 gatos procedentes de Botucatu-SP, 2009.



Figura 2: Hemocultura de cão, positiva para tripanossomatídeo em meio LIT (Liver Infusion Tryptose). 1000x. Botucatu-SP, 2009.

Dentre os cães, uma amostra foi diagnosticada na primeira leitura (10 dias após inoculação), duas com 25 dias de inoculação e uma após 40 dias. No grupo dos felinos, as amostras positivas foram diagnosticadas já na primeira leitura (**Gráfico 2**).

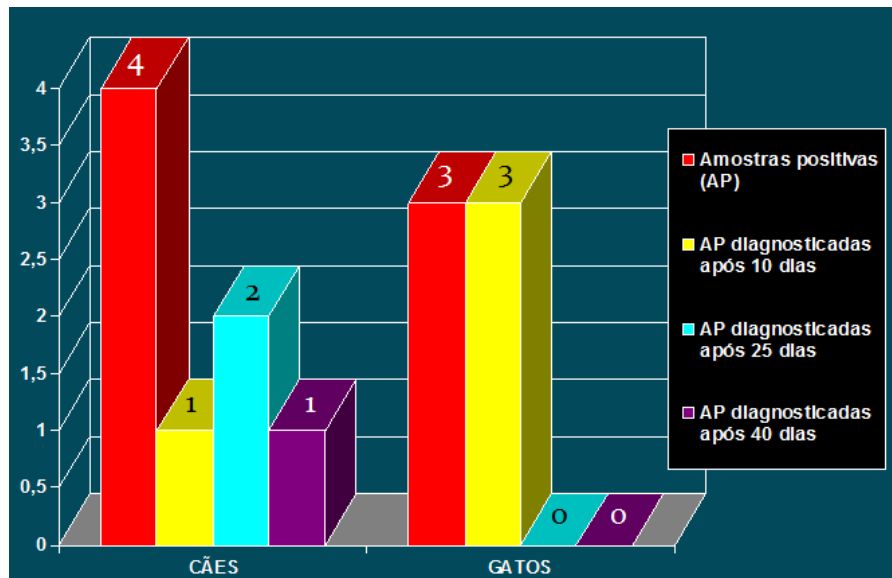


Gráfico 2: Hemoculturas positivas para tripanossomatídeo relacionadas ao tempo de leitura para o diagnóstico. Botucatu-SP, 2009.

Em relação aos cães positivos, uma amostra relacionava-se à porção leucocitária e as outras três à porção do sedimento de hemácias. Dentre os gatos positivos, todas as amostras eram do sedimento de hemácias (**Gráfico 3**).

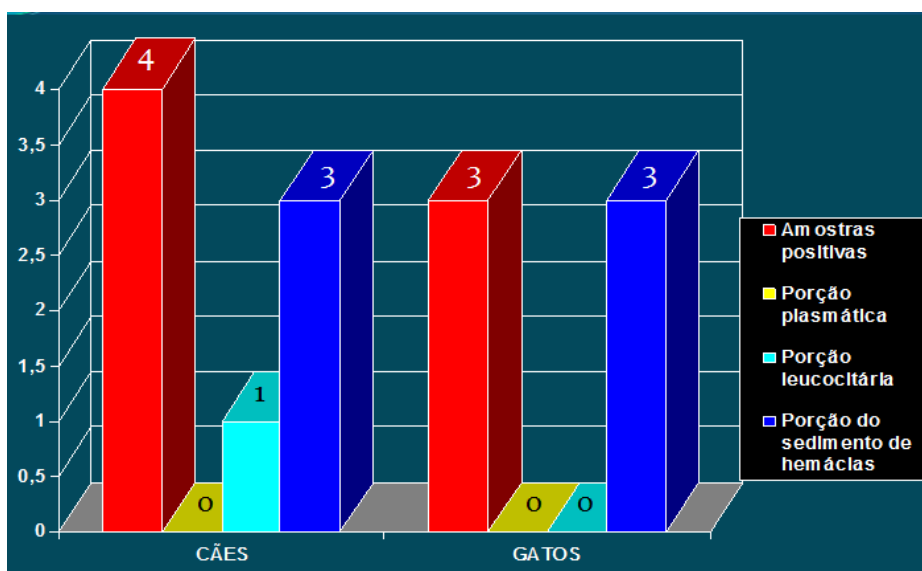


Gráfico 3: Hemoculturas positivas para tripanossomatídeo relacionadas às porções sanguíneas inoculadas em meio LIT. Botucatu-SP, 2009.

5.1.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* utilizando os iniciadores P35/P36

Dos 50 cães avaliados, dez (20%) foram positivos, assim como em relação aos 50 gatos, dez (20%) apresentaram produtos amplificados de 330 pares de bases (pb) de comprimento, correspondendo à amplificação do fragmento contendo uma região específica do minicírculo de kDNA do *T. cruzi* e/ou do *T. rangeli* (Gráfico 4 / Figura 3) (52).

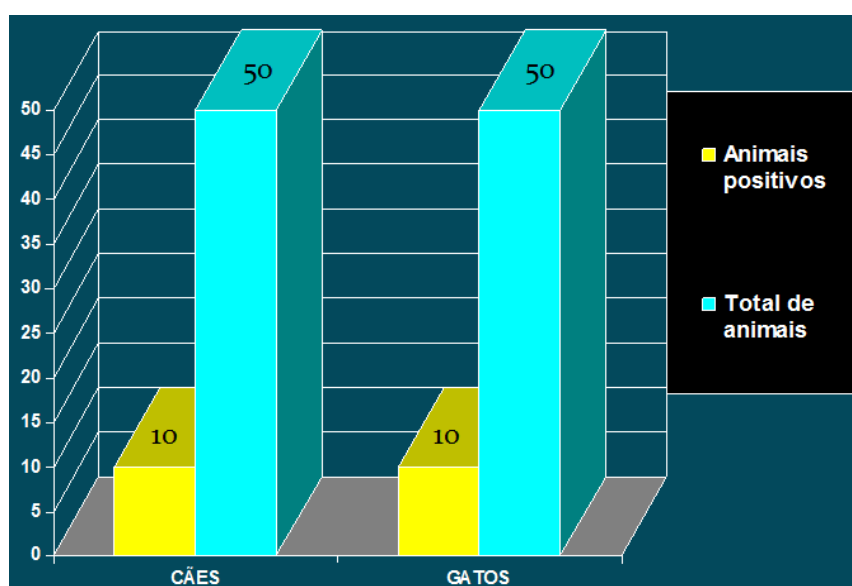


Gráfico 4: Detecção de *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores P35/P36, em 50 cães e 50 gatos procedentes de Botucatu-SP, 2009.

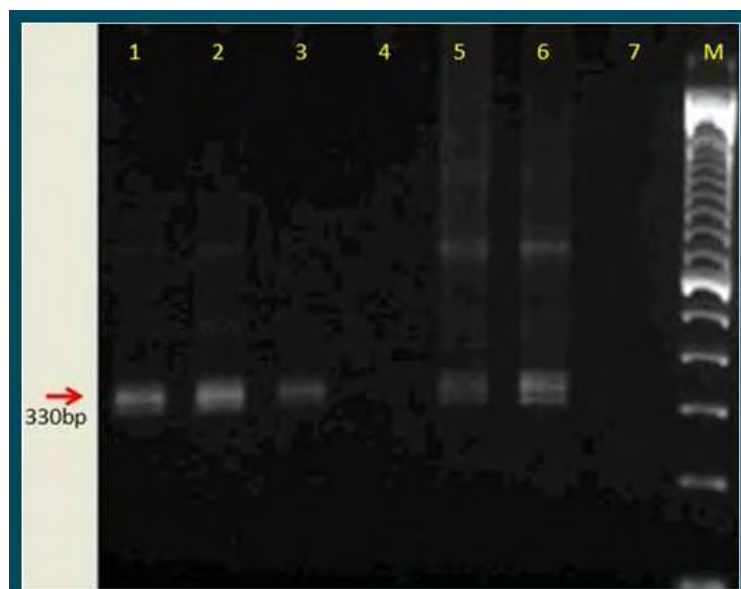


Figura 3. Gel de agarose à 1,0% corado com Gelred™. Amplificação dos fragmentos do *Trypanosoma cruzi* e/ou *Trypanosoma rangeli* pela PCR, em cinco amostras de hemocultura de **cães** e **gatos** de Botucatu-SP. 1: Controle positivo (cepa Y de *T. cruzi*); 2: **Cão 50**; 3: **Gato 33**; 4: **Cão 9**; 5: **Gato 50**; 6: **Cão 44**; 7: Controle negativo (MIX de PCR); M: Peso molecular padrão para DNA (100 pb – NORGEN®). Botucatu-SP, 2009.

5.1.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *T. cruzi* utilizando os iniciadores TCZ1/TCZ2

Todas as hemoculturas dos 100 animais de Botucatu-SP foram novamente submetidas à PCR, utilizando-se os iniciadores TCZ1/TCZ2, os quais amplificam produtos de 188 pares de base (pb) de comprimento, correspondendo ao fragmento que contém região específica de microssatélite de nDNA do *T. cruzi*. Somente as 20 amostras (dez cães e dez gatos) que foram positivas para *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* à PCR com os iniciadores P35 e P36, também foram positivas à PCR com os iniciadores TCZ1/TCZ2 (Gráfico 5 / Figura 4 / Figura 5) (58).

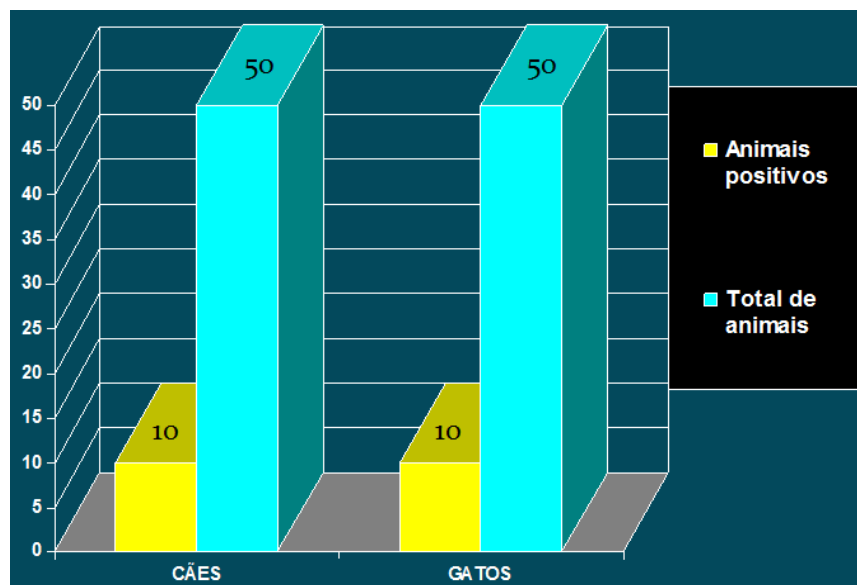


Gráfico 5: Detecção de *T. cruzi* pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores TCZ1/TCZ2, em 50 cães e 50 gatos procedentes de Botucatu-SP, 2009.

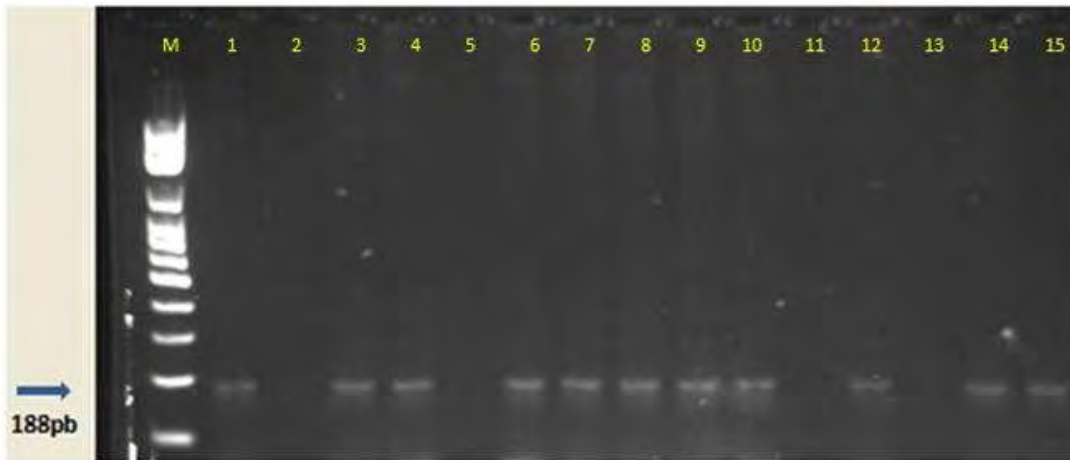


Figura 4: Gel de agarose à 1,0% corado com Gelred™. Amplificação dos fragmentos de 188 pb do *Trypanosoma cruzi* pela PCR, em 13 amostras de hemocultura de **cães** de Botucatu-SP. M: Peso molecular padrão para DNA (100 pb – NORGEN®); 1: Controle positivo (cepa Y de *T. cruzi*); 2: Controle negativo (MIX de PCR); 3: **Cão 40**; 4: **Cão 41**; 5: **Cão 10**; 6: **Cão 42**; 7: **Cão 43**; 8: **Cão 44**; 9: **Cão 45**; 10: **Cão 46**; 11: **Cão 01**; 12: **Cão 47**; 13: **Cão 48**; 14: **Cão 49**; 15: **Cão 50**. Botucatu-SP, 2009.



Figura 5: Gel de agarose à 1,0% corado com Gelred™. Amplificação dos fragmentos de 188 pb do *Trypanosoma cruzi* pela PCR, em 13 amostras de hemocultura de **gatos** de Botucatu-SP. M: Peso molecular padrão para DNA (100 pb – NORGEN®); 1: Controle positivo (cepa Y de *T. cruzi*); 2: Controle negativo (MIX de PCR); 3: **Gato 32**; 4: **Gato 33**; 5: **Gato 35**; 6: **Gato 17**; 7: **Gato 36**; 8: **Gato 37**; 9: **Gato 23**; 10: **Gato 38**; 11: **Gato 39**; 12: **Gato 40**; 13: **Gato 49**; 14: **Gato 45**; 15: **Gato 50**. Botucatu-SP, 2009.

Dos 50 cães estudados, nenhum apresentou positividade à ambas as técnicas (**Tabela 1**). Já dentre os gatos, um animal (2%) apresentou positividade tanto à hemocultura quanto à PCR (**Tabela 2**).

Tabela 1. Resultados de hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2, em 50 cães de Botucatu-SP, 2009.

PCR \ Hemocultura	positivo		negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
positivo	0	(0)	10	(20)	10	(20)
negativo	4	(8)	36	(72)	40	(80)
Total	4	(8)	46	(92)	50	(100)

Tabela 2. Resultados de hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2, em 50 gatos de Botucatu-SP, 2009.

PCR \ Hemocultura	positivo		negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
positivo	1	(2)	9	(18)	10	(20)
negativo	2	(4)	38	(72)	40	(80)
Total	3	(6)	47	(94)	50	(100)

Dos 100 animais avaliados, somente um gato (1%) apresentou positividade tanto à técnica de hemocultura como à PCR (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resultados de hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2, em 100 animais (cães e gatos) de Botucatu-SP, 2009.

PCR \ Hemocultura	positivo		negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
positivo	1	(1)	19	(19)	20	(20)
negativo	6	(6)	74	(74)	80	(80)
Total	7	(7)	93	(93)	100	(100)

5.2 – Animais de Campo Grande

5.2.1 - Hemocultura

Todas as hemoculturas apresentaram resultado negativo para as leituras realizadas.

5.2.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR apresentaram resultado negativo para os iniciadores P35/P36 e TCZ1/TCZ2 utilizados.

5.3 - Análise Estatística

5.3.1 – Animais de Botucatu

De acordo com os valores abaixo obtidos:

Sensibilidade = 0,14

Especificidade = 0,89

VPP = 0,05

VPN = 0,92

RVP = 1,64

RVN = 1,04

Tem-se, então, que a técnica de hemocultura possui baixa sensibilidade e alta especificidade para identificar tripanossomatídeos. Essa postulação se confirma pela RVP, mostrando que a hemocultura identifica muitos falsos negativos, 64% e pela RVN, mostrando que a hemocultura possui 96% de chance de identificar negativos, ou seja, identifica quase que somente os negativos.

Além disso, o VPP mostra que a técnica de hemocultura possui baixa capacidade de prever os positivos e o VPN mostra que a técnica possui alta capacidade de prever negativos.

O coeficiente Kappa foi calculado separadamente para cães e gatos, obtendo-se:

Kappa para cães = 0,12

Kappa para gatos = 0,14

Esses resultados mostram a baixa concordância entre os testes.

De acordo com a **Tabela 4**, foi obtida uma diferença significativa entre as técnicas de PCR e hemocultura. Nota-se ainda que a PCR detecta 3,3 vezes mais cães e/ou gatos positivos em relação a hemocultura.

Tabela 4: Ajuste do Modelo de Regressão Logística para o diagnóstico positivo do *T. cruzi*, em relação às técnicas de PCR e hemocultura.

Variável	Estimativa	Erro Padrão	p-valor	OR (IC de 95%)
PCR	0,6002	0,2324	0,0098	3,332 (1,335 – 8,264)
Hemocultura	-	-	-	1
Intercepto	1,9865	0,2324	<0,0001	-

5.3.2 – Animais de Campo Grande

Para os animais procedentes de Campo Grande-MS não foi possível realizar a análise estatística, pois os resultados da PCR e hemocultura foram todos negativos.

6 – DISCUSSÃO

Cães e gatos infectados com *T. cruzi* participam do ciclo epidemiológico da doença de Chagas, mantendo os níveis de prevalência do parasita no sangue e atuando como fontes de infecção para o homem e outros animais (2, 13, 14).

Nos países do cone Sul, o cão e o gato possuem prevalência na faixa de 8% - 50% para o *T. cruzi*, que frequentemente excedem os valores encontrados no homem (2). Montenegro *et al.* (17), em 2002, e Souza *et al.* (7), em 2008, relataram que em áreas onde o *T. infestans* é o principal vetor domiciliar, as taxas de infecção de *T. cruzi* em cães e gatos são maiores que no homem. Andrade (66), em 2007, afirmou que a prevalência do *T. cruzi* no cão e no gato em áreas endêmicas é superior à encontrada no homem.

Em várias localidades do Brasil e Argentina, foram encontradas, pelo xenodiagnóstico, taxas de infecção em mais de 20% dos cães. No Valle de Yaracuy, Venezuela, 70 de um total de 140 cães examinados tiveram o xenodiagnóstico positivo. No Chile foram examinados 3.321 cães, encontrando-se 9,1% de positividade (67).

Em relação aos gatos, o xenodiagnóstico revelou no Brasil uma prevalência de 18%-30% de gatos infectados em áreas onde se encontra o *T. infestans*, *P. megistus* ou *T. brasiliensis*. No noroeste da Argentina, estudo realizado com amostras de 30 gatos revelou prevalência variando de 18%-39%, determinada também pelo xenodiagnóstico (13).

Os cães e gatos do universo amostral do presente estudo, procedentes do município de Botucatu-SP estão exercendo papel de reservatórios domésticos de *T. cruzi*, sendo que 20% deles encontraram-se infectados por esse tripanossomatídeo, de acordo com os resultados da PCR. Já em relação aos animais de Campo Grande-MS, de acordo com os resultados da PCR e hemocultura e para o universo amostral do presente trabalho, não representaram, no momento estudado, papel de reservatórios domésticos de *T. cruzi*, pois os resultados da PCR e hemocultura foram todos negativos.

Em relação aos testes de hemocultura utilizados neste estudo, para os animais de Botucatu-SP, dos 50 cães, quatro amostras (8%) apresentaram parasitas viáveis na hemocultura e, das 50 amostras de gatos, em três delas (6%) observaram-se formas parasitárias.

Já à PCR, dos 50 cães avaliados de Botucatu-SP, dez (20%) foram positivos, assim como em relação aos 50 gatos, dez (20%) apresentaram produtos amplificados de 330 pb, quando utilizados os iniciadores P35/P36 e, posteriormente, esses mesmos 20 animais também apresentaram produtos amplificados de 188 pb, quando utilizados os iniciadores TCZ1/TCZ2.

Esses resultados corroboram os de Egler Chiari (68), em 1999, que utilizou a PCR como padrão ouro no diagnóstico de 126 amostras de sangue de indivíduos chagásicos de áreas endêmicas e não endêmicas para a doença de Chagas em Minas Gerais, encontrando positividade de 83,5% (66 de 79) nos indivíduos com sorologia positiva, 47,6% (10 de 21) nos indivíduos com sorologia negativa e 46,2% (6 de 13) em indivíduos com sorologia inconclusiva. Os resultados da PCR também foram positivos, para todos os indivíduos que tiveram hemocultura positiva, para 37 indivíduos com hemocultura negativa e sorologia positiva e para dois de seis indivíduos com sorologia inconclusiva e hemocultura negativa. Nos 13 indivíduos de áreas não endêmicas que foram usados como grupo controle e que tiveram sorologia negativa, a PCR teve 100% de resultado negativo.

De acordo com Egler Chiari (68), em 1999, esses resultados mostraram que a PCR é um método muito sensível para detectar o *T. cruzi* em pacientes chagásicos crônicos, tendo sua sensibilidade em torno de 96 a 100% (69, 70), e que testes parasitológicos indiretos tais como hemocultura e xenodiagnóstico possuem alta especificidade, mas baixa sensibilidade, o que justificaria a baixa positividade em seu estudo e o uso da PCR como padrão ouro de diagnóstico.

A análise estatística do presente estudo corrobora esses dados, mostrando baixa sensibilidade para a hemocultura e alta especificidade e sensibilidade para a PCR.

Zijlstra *et al.* (71), em 1992, em estudo realizado com pacientes crônicos para o Calazar, doença causada também por um tripanossomatídeo, a *Leishmania chagasi*, apresentaram valores de sensibilidade para os testes parasitológicos diretos de 58%, 70% e 96%, para aspirados de linfonodo, medula óssea e baço, respectivamente e, especificidade de 100%. Por esta razão o exame parasitológico direto é considerado como padrão ouro no diagnóstico de tripanossomatídeos. Por outro lado, os testes parasitológicos indiretos, como a hemocultura e xenodiagnóstico, não podem ser considerados como padrão ouro, pois apresentam baixa sensibilidade, diferente da PCR, que apresenta valores de sensibilidade e especificidade perto de 100%, podendo também ser considerada como padrão ouro (72, 73).

Da mesma maneira, Araújo *et al.* (65), em 2002, encontraram 100% de positividade à PCR e somente 22% à hemocultura para cães infectados experimentalmente.

Por outro lado, Chiari *et al.* (74), em 1989 e Gomes *et al.* (75), em 1999, afirmaram que o cultivo do sangue ou hemocultura em meio LIT alcança, na forma crônica da doença, até 94% de positividade.

Luz *et al.* (48), em 1994, registraram sensibilidade de 94% com três exames de hemocultura em meio LIT destacando-se, já no primeiro teste, 79% de positividade e empregaram o método modificado com três cultivos de 30 mL de sangue e processamento imediato do exame, com o tempo máximo de 30 minutos.

Já Chiari e Brenner (76), em 1966, obtiveram 31,4% de positividade em xenodiagnóstico e 25,7% em hemocultura em meio LIT de uma amostra de 35 pacientes chagásicos crônicos.

A forma crônica da doença de Chagas caracteriza-se por baixo nível de parasitemia. O diagnóstico laboratorial nessa fase pode ser realizado por diversas técnicas, porém todas com limitações. Os exames parasitológicos indiretos, como a hemocultura, consistem no

enriquecimento da amostra de sangue, possibilitando a multiplicação dos parasitas existentes; são exames com alta especificidade, mas não podem ser considerados como padrão ouro por terem sensibilidade limitada nessa forma, decorrente da parasitemia baixa e transitória (49, 68). Sua sensibilidade aumenta quando o volume e o número de amostras é maior, o tempo entre a colheita e o processamento é menor, quando se utiliza o meio LIT para cultivo (50) e quando se manipula menos as amostras de sangue (77).

Devido a hemocultura ser utilizada na fase crônica da doença de Chagas, é necessária a realização de pelo menos cinco lâminas, com observação atenta aos vários campos de cada lâmina e a interpretação definitiva de um resultado como negativo apenas após a leitura de todas as lâminas. Ainda, é necessário que o observador reconheça os movimentos rápidos dos tripanossomatídeos, como o *T. cruzi*, para que não haja confusão com outros protozoários, bactérias e fungos, possivelmente presentes na hemocultura (78).

Além disso, a identificação precisa do tripanossomatídeo, isolado pela hemocultura apenas pela observação direta ao microscópio, é bastante limitada e, algumas vezes, impossível de ser realizada, pois certos estágios de desenvolvimento de alguns tripanossomatídeos são indistinguíveis entre si, sendo necessária a identificação pela prova molecular. É o caso do *T. cruzi* e do *T. rangeli*, que não podem ser identificados em preparações a fresco e em esfregaços corados, causando freqüentes erros diagnósticos. Nesse caso, a diferenciação molecular específica desses parasitas é uma medida necessária (79).

No presente estudo, as amostras de sangue colhidas dos animais de Campo Grande-MS e Botucatu-SP não foram igualmente processadas. As amostras de Botucatu-SP, após serem processadas para as hemoculturas, foram incubadas e mantidas por até quatro meses em estufa de 28°C - 30°C, sendo retiradas apenas para as leituras quinzenais. As amostras de Campo Grande-MS, entretanto, foram transportadas em caixas de isopor sob refrigeração de Campo Grande-MS a Botucatu-SP, permanecendo nestas condições por várias horas até

serem incubadas em estufa a 28°C - 30°C, sendo retiradas apenas para as leituras quinzenais. Essas condições adversas podem ter inviabilizado a sobrevivência do parasita, que ali pudesse estar presente, causando sua morte e evitando sua multiplicação no meio LIT. Por outro lado, a PCR também não demonstrou a presença do *T. cruzi* nas hemoculturas das amostras de Campo Grande-MS, o que pode significar, a real negatividade desses animais para o protozoário.

Como a fase crônica da doença de Chagas também se caracteriza pelo alto nível de anticorpos na circulação, alguns autores, como Rubio (80) relatam que o soro humano normal e o de várias espécies animais têm mostrado efeito lítico nas formas epimastigotas do *T. cruzi* in vitro devido a ação de anticorpos. Outra provável interferência seria a presença dos leucócitos, em que o crescimento do *T. cruzi* em culturas de sangue de pacientes crônicos poderia ser inibido pela atividade das células brancas do sangue. Dessa forma, a sobrevivência prolongada e a multiplicação aparente in vitro das células brancas mostraram que as condições de cultura eram favoráveis e a atividade imune mediada por células como linfócitos e/ou monócitos poderia ser responsável pela supressão do crescimento dos tripanossomas em hemoculturas. Além disso, macrófagos ativados poderiam provocar a destruição desses parasitas, demonstrada experimentalmente (80).

Em 1975, Mourão e Melo (81), desenvolveram um processo para retirada do plasma e lavagem das células, a fim de remover os anticorpos ou outros fatores que pudessem, aparentemente, inibir o crescimento do *T. cruzi* em culturas de sangue. Alguns autores sugerem que a diminuição da positividade na hemocultura possa ser, provavelmente, devida à ação lítica de imunoglobulinas presentes no plasma de pacientes crônicos (74) ou, de acordo com Pífano (82), devida à presença em potencial de macrófagos nessa porção do sangue.

Por outro lado, Barbosa *et al*, (83), observaram que anticorpos, complemento e células sensibilizadas, na quantidade que habitualmente participam do inóculo, não interferiram no resultado da hemocultura.

Embora alguns autores afirmem que cultivar as porções plasmáticas e leucocitárias do sangue possa diminuir a viabilidade dos parasitas presentes na amostra, a separação dessas porções sanguíneas também pode levar ao mesmo problema, devido a grande manipulação dessas amostras no momento da separação e inoculação das porções do sangue no meio LIT.

Assim, além dos entraves citados anteriormente, a baixa positividade nas hemoculturas dos animais de Botucatu-SP e também a negatividade total nas hemoculturas dos animais de Campo Grande-MS pode ter ocorrido devido à manipulação excessiva das amostras de sangue no momento da separação das porções sanguíneas antes do processamento para as hemoculturas.

Em relação ao volume de sangue recomendado para a hemocultura, que é de 30 mL para humanos (48, 75), no caso dos animais desta pesquisa, padronizou-se colher de 5 mL – 8 mL por animal, a fim de se adequar à variabilidade de peso e idade dos cães e gatos. É provável que um volume maior de sangue inoculado ou mesmo um número maior de culturas por animal poderia aumentar a sensibilidade dos testes de hemocultura.

Outro fator relacionado à hemocultura é o tempo de visualização do parasita. Minter Goedbloed *et al* (84), em 1978, mostraram que o número de resultados positivos aumenta quando as culturas eram examinadas com mais de 6 meses de incubação. Por outro lado, no presente estudo, os resultados mostraram que, das sete amostras positivas para a hemocultura dentre os animais de Botucatu-SP, apenas uma foi diagnosticada após 40 dias de inoculação. Esse fato sugere a possibilidade de que a sobrevivência do *T. cruzi* no meio LIT diminua com o passar do tempo ao invés de sua multiplicação.

O emprego da hemocultura fica restrito então, à sua baixa sensibilidade, ao tempo prolongado para o resultado final (85), além da possibilidade de sobrevivência do parasita no meio LIT diminuir ao longo do tempo.

A PCR tem sido utilizada como alternativa no diagnóstico da doença de Chagas. Os iniciadores de 188 pb e os de 330 pb vêm demonstrando sensibilidade de até 100% no diagnóstico da forma crônica (86). Com o emprego de outro par de iniciadores, que amplifica 692 pares de base do genoma, denominado BP1/BP2, observou-se 100% de sensibilidade, comparativamente aos métodos sorológicos, em sangue de crianças com doença de Chagas na Argentina (83).

A hemocultura e o xenodiagnóstico são considerados importantes no diagnóstico da doença de Chagas, mesmo com algumas limitações relevantes, como tempo prolongado para o resultado final e necessidade de grandes quantidades de sangue, estendendo-se à manutenção de ninfas no caso do xenodiagnóstico, gerando dificuldades na sua aplicação rotineira e em banco de sangue. Assim, diante da baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos indiretos e da maior sensibilidade e alta especificidade, a PCR torna-se fundamental no complemento do diagnóstico dessa zoonose (49).

Os resultados negativos de todos os testes do presente estudo, aplicados aos animais provenientes de Campo Grande-MS, diferem dos encontrados por Cardinal *et al.* (87), em 2008. Esses autores, em estudo realizado na província de Santiago del Estero, na região do Chaco na Argentina, avaliaram a ocorrência de *T. cruzi* em 2.243 *T. infestans*, 697 cães domésticos, 109 gatos, 586 mamíferos selvagens e 612 humanos, entre os anos de 2000 e 2007, pela técnica de PCR. O parasita foi detectado em 94 *T. infestans*, 57 cães domésticos, cinco gatos, cinco gambás e uma doninha. Por outro lado, nos humanos, o protozoário não foi encontrado.

Da mesma forma, estudos em determinadas regiões endêmicas detectaram, em pacientes com reações sorológicas positivas para a doença, sensibilidade à PCR de 96,5% a

100% (83). No entanto, na Paraíba, Brito *et al.* (88), em 1995, encontraram em amostras de doadores de sangue, com os mesmos iniciadores, apenas 45% de positividade.

No Piauí, em pacientes com doença de Chagas crônica comprovada sorologicamente, verificou-se positividade de 34% ao xenodiagnóstico, 25,7% à hemocultura e 59,5% à PCR (89). No mesmo estudo, na Paraíba, os autores observaram positividade de 13% ao xenodiagnóstico e 44,6% à PCR; a hemocultura não foi realizada.

Esses dados sugerem diferenças regionais, uma das quais seria representada por parasitemia menor e transitória, na forma crônica da doença, conforme a área geográfica estudada. No Nordeste, observou-se variabilidade de positividade de exames parasitológicos indiretos e PCR em duas áreas estudadas (89). Um fator que poderia estar relacionado a tal variabilidade, residiria na diferença genética dos isolados (49).

Além disso, atenta-se para o fato de que a prevalência da doença de Chagas na região da província de Santiago del Estero, na Argentina, possa ser maior que na região de Campo Grande-MS, pois a região do Chaco é considerada endêmica para a doença de Chagas. Esse fator justificaria a negatividade dos testes aplicados aos animais de Campo Grande-MS no presente estudo.

Da mesma maneira, em 2001, Borges-Pereira *et al.* (9), em estudo realizado na região do Distrito Sanitário de Rio Verde-MS, encontraram 1,83% de soropositivos, sendo um percentual abaixo dos 2,46% estimados para o estado do Mato Grosso do Sul, de acordo com o inquérito sorológico nacional realizado no período de 1975 a 1980 (8). Essa queda da prevalência na área estudada pode ser atribuída ao sucesso das medidas de controle dos triatomíneos domiciliados implementadas na década de 80, especialmente dirigidas para o *T. infestans*, que era uma das espécies capturadas em dez municípios da área estudada até 1983 (90). O sucesso do controle pode ser comprovado pela não captura dessa espécie no estado, no período de 1993 a 1997 (91).

De acordo com Borges-Pereira *et al.* (9), em 2001, a baixa positividade para *T. cruzi* deve estar reproduzindo a dinâmica atual dos elementos da cadeia epidemiológica da doença de Chagas em alguns locais do estado do Mato Grosso do Sul como no Distrito de Rio Verde, devido a manutenção dos nichos silvestres pela preservação ambiental, o pequeno número de habitações propícias à colonização de triatomíneos e as próprias características biológicas do principal triatomíneo da região, o *T. sordida*, essencialmente peridomiciliar e com baixo potencial de transmissão da infecção chagásica.

Por outro lado, Souza *et al.* (92), em 2009, em estudo onde avaliaram-se 75 amostras de sangue de cães provenientes de uma área rural no município de Jaraguari, a 35 Km ao norte da capital Campo Grande, encontraram uma soroprevalência de 45,3% na RIFI e 24,05 no ELISA, valores que se aproximaram do observado em regiões endêmicas na Argentina, em 1989 (93), e na Costa Rica, em 2002 (17), confirmando assim a infecção chagásica nos cães de Mato Grosso do Sul.

As taxas de infecção natural nos cães por *T. cruzi* variam muito conforme a situação epidemiológica local, sendo geralmente altas quando estão elevados os índices triatomínico-tripanosômicos de uma unidade domiciliar ou localidade. Inquéritos de campo, realizados por toda a América Latina, têm mostrado grandes variações na infecção natural de cães, com extremos de 3% a 60%, e maiores concentrações entre 8% e 28% (19).

Altos níveis de prevalência de *T. cruzi* em cães (acima de 50%), e em populações humanas, têm sido relatados em áreas rurais da Argentina (94), Venezuela (95) e Bolívia (96). Outros níveis mais baixos de infecção em cães, em torno de 10% a 30%, têm sido encontrados em outros países da América Central e do Sul, o que sugere circunstâncias epidemiológicas diferentes, dependendo da região estudada (97).

Assim, apesar da negatividade para *T. cruzi*, em relação aos animais de Campo Grande-MS, do presente estudo, submetidos à hemocultura e à PCR da hemocultura,

observou-se que o estado do Mato Grosso do Sul e a região de Campo Grande apresentam alta ocorrência da doença de Chagas (98).

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a área endêmica ou, mais precisamente, com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no país, conhecida no final dos anos 70, incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos (99).

Hoje, o perfil epidemiológico da doença apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos e surtos na Amazônia Legal, por transmissão oral, vetorial (domiciliar sem colonização e extradomiciliar) e casos isolados em outros estados. Com isso, evidenciam-se duas áreas geográficas onde os padrões de transmissão são diferenciados: a) a região originalmente de risco para a transmissão vetorial, onde ações de vigilância epidemiológica, entomológica e ambiental devem ser concentradas, com vistas à manutenção e sustentabilidade da interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans* e por outros vetores passíveis de domiciliação; b) a região da Amazônia Legal, onde a doença de Chagas não era reconhecida como problema de saúde pública (99).

A alteração do quadro epidemiológico da doença de Chagas no Brasil promoveu a mudança nas estratégias de vigilância, prevenção e controle, pela adoção de um novo modelo de vigilância epidemiológica, de acordo com os padrões de transmissão da área geográfica em:

- a) Regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial (AL, BA, CE, DF, GO, MA, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RN, RS, SE, SP, TO), onde a vigilância epidemiológica visa detectar a presença e prevenir a formação de colônias domiciliares do vetor;
- b) Amazônia Legal (AC, AM, AP, RO, RR, PA, TO, parte do MA e do MT), onde a vigilância fica centrada na detecção de casos agudos e surtos, apoiando-se na Vigilância Epidemiológica da Malária (100).

A história da doença de Chagas na região do Mato Grosso do Sul teve seu início em 1918, com Chagas (101) revelando a presença do *T. cruzi* em tatus, enquanto os primeiros relatos sobre os triatomíneos das espécies *P. megistus* e *T. sordida* foram feitos por Neiva e Pinto em 1923 (102). No período de 1975 e 1979, Silva (103) identificou casos humanos, reservatórios domésticos e silvestres na região de Fátima do Sul e registrou o encontro de *T. infestans* naturalmente infectado nos domicílios rurais e de *T. sordida*, *R. neglectus* e *Panstrongylus geniculatus* em biótopos naturais.

No inquérito sorológico nacional (8), sobre a doença de Chagas, realizado no período de 1975 a 1980, estimou-se em 2,5% a soroprevalência para todo o estado do Mato Grosso do Sul. Em seguida, no inquérito sorológico realizado em escolares de 7 a 14 anos, no período de 1994 a 1997, estimou-se a soroprevalência em 0,05% (dois casos em 3.891 examinados) (91). Em 1999, a soropositividade de 1,1% de primodoadores matriculados no Hemocentro de Campo Grande, no período de julho de 1984 a fevereiro de 1985, foi definida por Aguiar e Aguiar (104), ressaltando a ausência de casos autóctones. Em 2001, Borges-Pereira *et al.* (9), encontraram 1,83% de soropositivos entre 14.709 investigados no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, na área urbana de 12 municípios do Distrito Sanitário de Rio Verde.

De acordo com Pompilio *et al.* (98), em 2005, em estudo realizado no período de maio/98 a novembro/99 com 120 pacientes com sorologia positiva para a infecção chagásica, atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), foram identificados 26,1% de xenodiagnósticos com resultado positivo. O confronto desses dados com os de outros trabalhos mostra que esse percentual de positividade dos xenodiagnósticos não difere dos percentuais encontrados em áreas endêmicas de Minas Gerais, sendo significativamente maior que os 13% encontrados em chagásicos de áreas endêmicas do Sertão da Paraíba e significativamente menor do que os 36% encontrados por Castro (105) entre os chagásicos de Mambaí-GO.

Pompilio *et al.* (98), em 2005, analisando o perfil epidemiológico dos chagásicos de seu estudo realizado, encontraram predominância de alóctones procedentes principalmente de áreas rurais com baixa escolaridade e antecedente de intenso contato com os triatomíneos. Esse perfil, mostrando maior participação de alóctones em sua casuística, expressa as características da população do Mato Grosso do Sul, constituída por parcela significativa de migrantes de outras regiões, principalmente do sul do Brasil.

Corroborando os estudos de Pompilio *et al.* (98), em 2005, sobre a ocorrência da doença de Chagas no estado do Mato Grosso do Sul, Souza *et al.* (92), em 2009, em estudo onde avaliaram-se 75 amostras de sangue de cães provenientes de uma área rural no município de Jaraguari, a 35 Km ao norte da capital Campo Grande, encontraram uma soroprevalência de 45,3% na RIFI e 24,05 no ELISA. Este percentual da RIFI foi muito superior ao observado em outra área do estado, onde Silva (103), em 1979, detectou apenas 3% de positividade e aproximou-se do observado em regiões endêmicas na Argentina por Lauricella *et al.* (93), em 1989, e na Costa Rica, por Montenegro *et al.* (17), em 2002, confirmando assim a ocorrência da infecção chagásica nos cães de Mato Grosso do Sul.

Por outro lado, Borges-Pereira *et al.* (9), em 2001, em estudo realizado no Distrito sanitário de Rio Verde-MS, onde foi avaliada a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, pela RIFI, Hemaglutinação Indireta (HAI) e Elisa, em amostras de sangue de 14.709 pessoas, residentes (11.460 autóctones e 3.249 alóctones) em 10% das ruas de cada município, encontraram uma soropositividade total da infecção chagásica humana, dentre adultos e crianças, de 1,83% da população estudada, sendo um percentual menor que os 2,46% estimados para o estado do Mato Grosso do Sul e que os 4,2% estimados para o Brasil, de acordo com o inquérito sorológico nacional realizado no período de 1975 a 1980 (8). Essa queda da prevalência na área estudada pode ser atribuída ao sucesso das medidas de controle dos triatomíneos domiciliados implementadas na década de 80, especialmente dirigidas para o *T. infestans*, que era uma das espécies capturadas em 10 municípios da área

estudada até 1983 (90). O sucesso do controle pode ser comprovado pela não captura dessa espécie no estado, no período de 1993 a 1997 (91).

A soropositividade de 5,1% entre os alóctones do distrito sanitário de Rio Verde-MS, reproduzindo a prevalência de 4,2% estimada para todo o Brasil, pode ser explicada pela origem dos migrantes, predominantemente dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná com prevalências acima da média nacional (106). Por outro lado, a soropositividade de 0,93% entre os autóctones deve estar reproduzindo a dinâmica atual dos elementos da cadeia epidemiológica da doença de Chagas no Distrito de Rio Verde, com destaque para a manutenção dos nichos silvestres pela preservação ambiental, o pequeno número de habitações propícias à colonização de triatomíneos e as próprias características biológicas do principal triatomíneo da região, o *T. sordida*, essencialmente peridomiciliar e com baixo potencial de transmissão da infecção chagásica (9). Essa diferença de soropositividade entre alóctones e autóctones foi observada por Aguiar *et al.* (107), em 1998, entre primodadores examinados no Hemocentro de Campo Grande-MS.

A infecção chagásica no Distrito Sanitário de Rio Verde pode ser caracterizada por prevalência associada principalmente aos alóctones e com pequena probabilidade de ocorrência de novos casos dependentes da transmissão vetorial, indicando a relevância das medidas de controle dos triatomíneos e a prioridade na condução do controle na qualidade do sangue a ser transfundido, principalmente de doadores alóctones.

O percentual de xenodiagnósticos positivos de 17,2% é menor que os valores encontrados em chagásicos crônicos de outras regiões com alta prevalência da doença, como em Mambá-GO (105). Por outro lado, não difere do valor observado no Sertão da Paraíba (108). Essas diferenças, independentemente das possíveis características regionais e amostrais, podem estar relacionadas com os resultados da aplicação do exame direto ou indireto, diferentes sensibilidades das espécies de triatomíneos à infecção pelo *T. cruzi* e ao método de leitura das ninfas (9). Nesse contexto, Pompilio *et al.* (109), em 1998, ao aplicarem

diretamente o xenodiagnóstico em 92 chagásicos autóctones e alóctones, matriculados no HU-UFMS, encontrou 26,1% de positivos, desempenho melhor que o encontrado por Borges-Pereira *et al.* (9), em 2001. Apesar disso, Borges-Pereira *et al.* (9), em 2001, puderam assim caracterizar o quadro da doença de Chagas humana na região de Campo Grande-MS representado por soropositividade para anticorpos anti-*T. cruzi* predominantemente entre os alóctones.

Em relação à doença de Chagas no estado de São Paulo, há referências sobre a existência de triatomíneos datada de 1910 a 1912, pelos trabalhos de Arthur Neiva (110, 111). Posteriormente, Bayma (112) assinalou a presença de casos crônicos da doença de Chagas e Carini & Maciel (113, 114) lançaram em mapas as localidades positivas e descreveram o habitat dos transmissores: *T. infestans*, *T. sordida* e *P. megistus*. Logo depois, vieram os estudos de Vilela (115) com o encontro do primeiro caso, na forma aguda da doença, no estado, e de Gomes (116), revendo a distribuição dos focos.

Após um período de duas décadas, ou seja, a partir da década de 40, estudos como os de Rosenfeld & Cardoso (117), Pessoa (118) e Freitas (119) passaram a chamar a atenção sobre a extensão e a gravidade do problema no planalto paulista, contribuindo, de certa forma, para que o então Departamento de Saúde do Estado, em maio de 1950, determinasse o início das atividades oficiais de combate aos vetores em nosso meio, pelo Serviço de Profilaxia da Malária (SPM), hoje SUCEN (120).

No estado de São Paulo, considerou-se que a transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans* foi interrompida desde o início dos anos 70. Mesmo nas áreas das microrregiões de Itapetininga e Avaré que, durante o período de controle seletivo, mantiveram os mais altos índices de infestação, a transmissão foi considerada interrompida em 1974, pois, a partir de então, verificou-se que poucos dos exemplares de triatomíneos, dentre os capturados, estavam infectados (28).

As ações de controle, centradas no tratamento químico domiciliar das habitações infestadas, foram sistematizadas em 1975 e alcançaram toda a área endêmica a partir de 1983. Inquéritos sorológicos e entomológicos, de âmbito nacional, serviram para determinar a área com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no país, entre os anos de 1975 e 1983. A prevalência da infecção no meio rural foi de 4,2%, excluindo o estado de São Paulo, onde, então, a transmissão já estava virtualmente interrompida (91). Se ocorreu uma “transmissão residual”, após esses anos, deve ter sido em uma área restrita na região de Sorocaba, em municípios pertencentes às microrregiões de Avaré e Itapetininga (121).

Godoy (121), em 2003, estudou evidências de transmissão vetorial do *T. cruzi* após o ano de 1983, nos domicílios e peridomicílios de indivíduos chagásicos residentes na região de Botucatu-SP e constatou que, em escolares nascidos entre 1973 e 1983, houve ausência de soropositividade a partir de 1982, indicando a eficiência da campanha de controle da doença de Chagas nessa região.

Porém, embora haja evidências de que a doença de Chagas esteja controlada na região de Botucatu-SP, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) ainda atende muitos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, diagnosticados tanto pelo Hemocentro, em seus doadores de sangue, quanto nas diferentes especialidades clínicas e cirúrgicas do hospital. As idades desses pacientes variam de 20 a 60 anos, sendo muito freqüente a referência, pelos próprios doentes, de já terem visto “barbeiros” em seus domicílios (122).

Mesmo diante da diminuição na ocorrência da doença no estado de São Paulo e na região de Botucatu-SP, os resultados positivos à hemocultura e PCR para *T. cruzi* para os animais desse município, no presente estudo, corrobora os achados de Lucheis *et al.* (18), em 2005, que estudaram um total de 50 cães pertencentes a 30 indivíduos chagásicos crônicos, na região oeste do Estado de São Paulo. Nesses animais foi realizado o xenodiagnóstico artificial, hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *T.*

cruzi. Um total de 43 cães (86%) foram reagentes a pelo menos um dos testes realizados, sendo 34 (68%) ao xenodiagnóstico, 30 (60%) à hemocultura e 25 (50%) à PCR.

Assim, pode-se especular que os 20% de positividade para os cães e gatos do presente estudo demonstram que essas espécies estão exercendo papel de reservatórios da doença de Chagas na região de Botucatu-SP.

O kDNA tem sido utilizado como uma ferramenta de diagnóstico para flagelados da ordem kinetoplastida, como o *T. cruzi*, pela PCR, devido a capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA do parasita em materiais biológicos, o que se deve à abundância de minicírculos. O alto grau de polimorfismo do kDNA juntamente com regiões conservadas favorecem a sua utilização para fins taxonômicos e genéticos (123), sendo amplamente utilizados para separar classes, gêneros ou espécies (124)

De acordo com Virreira *et al* (58), em 2003, os iniciadores de nDNA são indicados para detectar números baixos de parasitas em pequenos volumes de sangue, mas necessitam que sejam perturbados física ou quimicamente, pois esse procedimento interrompe parcialmente o denso DNA. Em contraste, uma ausência ou perturbação insuficiente de uma região do DNA que contenha elevadas repetições das seqüências-alvo, pode levar a uma distribuição aleatória de DNA nas amostras de PCR, resultando em excesso, diminuição ou ausência de amplificação.

O limite de detecção da PCR utilizando iniciadores TCZ1/TCZ2, é pelo menos, 0,002 parasitas/ensaio, ou seja, maior que o de outros iniciadores como os P35/P36. Além disso, sua sensibilidade é 10 vezes maior que a PCR utilizando os iniciadores P35/P36. Tais resultados podem estar relacionados à dispersão incompleta dos minicírculos do denso cinetoplasto presente nas amostras de sangue (58).

Em seu estudo, Virreira *et al* (58), em 2003, testaram seis pares de iniciadores e apenas os pares Diaz1/Diaz2 e TCZ1/TCZ2, detectaram todas as linhagens de *T. cruzi*, amplificando a seqüência repetitiva do DNA nuclear com uma intensidade semelhante. Em

contrapartida, observou-se que alguns dos iniciadores de nDNA, como Bp1/Bp2 ou O1/O2, amplificaram apenas algumas linhagens do parasita (62, 125).

Isso sugere que pode haver variações das seqüências repetitivas do nDNA entre linhagens. Além disso, embora os iniciadores P35/P36 também possam amplificar igualmente todas as linhagens de *T. cruzi* (126), observamos no estudo de Virreira *et al* (58), em 2003, que esses resultaram em fragmentos de diferentes intensidades.

Os iniciadores TCZ1/TCZ2 são capazes de detectar um único parasita em um volume de sangue de 0,1 mL. Essa sensibilidade deve ser suficiente para detectar a infecção tanto na fase aguda como na crônica da doença. Tais iniciadores podem ser potencialmente úteis na determinação da linhagem do parasita e para diagnóstico (58).

De todas as espécies de mamíferos domésticos reservatórios do *T. cruzi*, o cão e o gato, devido a sua grande proximidade com o homem, sua boa susceptibilidade à infecção chagásica e por atraírem o vetor, são os mais importantes na manutenção da endemia (14, 127). No entanto, por conta do hábito dos gatos de permanecerem a maior parte do tempo fora de casa, os cães são considerados os principais contribuintes domésticos, tanto qualitativa quanto quantitativamente, para a manutenção da transmissão da doença, principalmente em áreas endêmicas e são tidos como a principal fonte de alimento doméstico para triatomíneos, tais como *T. infestans*, *P. megistus* e *R. neglectus*, seguidos por humanos e aves (128, 129).

Assim, a ocorrência de 20% de animais infectados por *T. cruzi* dentre a espécie felina procedente de Botucatu-SP avaliados neste trabalho corrobora os resultados de outro estudo realizado por Cardinal *et al* (87), em 2008, que obtiveram 4,58% de positividade à PCR em 109 gatos estudados, concluindo-se que a espécie felina também é reservatório natural e eficiente desse protozoário.

De acordo com os resultados do presente estudo, torna-se necessária a continuidade deste trabalho, a fim de se investigar novos casos de cães e gatos infectados com *T. cruzi* na

região de Botucatu-SP, ou mesmo, na região de Campo Grande-MS, que apresenta alta ocorrência desse parasita. Além disso, é necessário ainda, avaliar de que forma esses animais se infectaram na região de Botucatu-SP e se, além de reservatórios, atuam também como fontes de infecção para o homem.

7 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos neste estudo permitem concluir que:

- 1) A ocorrência do *Trypanosoma cruzi* nos cães e gatos procedentes de Botucatu-SP demonstra a necessidade constante da vigilância epidemiológica para a doença de Chagas, bem como em Campo Grande-MS.
- 2) Cães e gatos do universo amostral estudado, procedentes do município de Botucatu-SP estão exercendo papel de reservatórios domésticos de *Trypanosoma cruzi*, não tendo sido detectado o parasita em animais procedentes de Campo Grande-MS.
- 3) A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresentou maior sensibilidade para o diagnóstico da doença de Chagas, nos cães e gatos estudados, em relação à hemocultura.
- 4) Os iniciadores TCZ1/TCZ2 confirmaram a positividade diagnóstica para *Trypanosoma cruzi* demonstrada pelos iniciadores P35/P36.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 Souza W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brenner Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan S.A. 2000. p.88-126.
- 2 Rosypal AC, Corte's-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Vet Parasitol.* 2007; 149: 172–7.
- 3 Schofield CJ, Dias JCP. The southern cone initiative against Chagas' disease. In: Baker JR, Muller R, Rollinson D. (Eds.). *Advances in Parasitology*. London: Academic Press, 1999. p.2-22.
- 4 World Health Organization. Control of Chagas` disease: report a WHO Expert Committee. Geneva; 1991. (WHO Technical Report Series, 811).
- 5 Dias JCP. Epidemiology of Chagas` Disease in Brazil. In: Brener RR, Stoka AM, (Eds.) *Chagas` Disease Vectors*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1987; 1: 57-81.
- 6 Assessoria de Comunicação. Universidade de Brasília. Consumidor deve ficar atento. Brasília; 2005 [Updated 2009 Aug 21; cited 2009 Set 13] Disponível em: <http://www.unb.br/acs/unbagencia/ag0405-03.htm>
- 7 Souza AI, Paulino-Júnior D, Sousa MG, Camacho AA. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciênc Rur.* 2008; 38(5): 1351-6.
- 8 Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1984; 26: 192-204.

* De acordo com as normas Vancouver

- 9 Borges-Pereira J, Zauza PL, Galhardo MC, Nogueira JS, Pereira GRL, Cunha RV. Doença de Chagas na população urbana do Distrito Sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(5): 459-66.
- 10 Litvoc J, Wanderlei DMV, Camargo LMA. Mortalidade por doença de Chagas no Estado de São Paulo (Brasil): subsídios para o planejamento da assistência ao chagásico. *Rev Saúde Pública São Paulo*. 1992; 26(2): 56-69.
- 11 Barreto MP. Tripanossomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1965; 7: 305-15.
- 12 Da Silva AV, Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol*. 2001; 97: 199-207.
- 13 Gurtler RE. Domestic dogs and cats as source of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*. 2007; 134: 69-82.
- 14 Brenner Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan S.A; 2000. p.21-46.
- 15 Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2000; 16(2): 7-12.
- 16 Wanderley DMV. Epidemiologia da Doença de Chagas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 1994; 4(2): 77-84.
- 17 Montenegro VM, Jiménez M, Dias JCP, Zeledón R. Chagas Disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(4): 491-4.
- 18 Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo Jr. JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J, et al. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11(4): 492-509.

- 19 Zeledón R. Epidemiology, mode of transmission and reservoir of Chagas' disease. In: Symposium on Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease, Caracas, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation; 1974. p.51-7.
- 20 Tejera E. Um nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n.sp. Bull Soc Path Exot. 1920; 13: 527.
- 21 D'Alessandro A, Hincapie O. *Rhodnius neivat*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35: 512-4.
- 22 Hoare CA. Herpetosoma from man and other animals: *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera. 1920; p.288-313. In: The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972.
- 23 Torres FD. Canine vector-borne diseases in Brazil. Parasites & Vectors. 2008; 1(25): 1-17.
- 24 Pífano F, Penalver LM, Medina R, Dominguez E. La infección natural del perro por el *Trypanosoma rangeli*. Primera comprobación de un reservorio vertebrado extra-humano de protozoario de la naturaleza. Gac Med Car. 1948; 56-7.
- 25 Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Lages-Silva E, *et al*. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31: 99-102.
- 26 Buralli GM. Estudo do controle dos triatomíneos domiciliados no Estado de São Paulo [Dissertação]. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo; 1985.
- 27 Souza AG, Wanderley DMV, Buralli GM, Andrade JCR. Consolidation of the control of Chagas' disease vectors in the State of São Paulo. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79: 125-31.
- 28 Wanderley DVM. Controle de *Triatoma infestans* no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1993; 25: 17-25.
- 29 Forattini OP, Rabello EX, Ferreira AO, Rocha e Silva EO, Santos JLF. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. XXI. Comportamento de espécies triatomínicas silvestres na reinfecção do intra e peridomicílio. Rev Saúde Pública. 1984; 18: 185-208.

- 30 Wood S, Wood F. New locations for Chagas` trypanosome in Califórnia. Bull South Calif Ac Sci. 1964; 63: 104-11.
- 31 Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas` disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 1991; 31: 547-57.
- 32 Dias JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. Cad Saúde Pública. 2001; 17: 165-9.
- 33 Ribeiro RD, Rissato Garcia TA, Bonoma WC. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. Rev Saúde Pública. 1987; 21: 51-4.
- 34 Argañaraz E, Hubbard GB, Ramos LA, Ford AL, Nitz N, Leland MM et al. Blood-sucking lice may disseminate *Trypanosoma cruzi* infection in baboons. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2002; 44(2): 97-103.
- 35 Neiva A. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* pelo *Rhipcephalus sanguineus* (Latr.) Brazil Médico, 1913; 46: 3-4.
- 36 Alcântara FG. Transmissão experimental do *Trypanosoma cruzi* a camundongos pelo pernilongo *Culex fatigans*. O Hospital. 1996; 69: 27-30.
- 37 Basso B, Castro I, Introini V, Gil P, Truyens C, Moretti E. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Vaccine. 2007; 25: 3855–8.
- 38 Chagas C. Aspecto clínico geral da nova entidade mórbida produzida pelo *Schyzotrypanum cruzi*. Bras Med. 1910; 24: 263-5.
- 39 Chagas C. Tripanossomíase americana: forma aguda da doença. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1916; 8: 37-60.
- 40 Ferreira MS, Lopes ER, Chapadeiro E, Dias JCP, Ostermayer AL. Doença de Chagas. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1997. v.2, p.1175-213.

- 41 Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31: 301-14.
- 42 Sobreira ACM, Gomes FVBAF, Silva MAM, Oliveira MF. Chagasic infection prevalence in blood donors for the Hemocentro Regional de Iguatu. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 193-6.
- 43 Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília; 1998. 373p.
- 44 Rocha e Silva EO, Andrade LCR, Lima AR. Importância dos animais sinantrópicos no controle da endemia chagásica. *Rev Saúde Pública.* 1975; 9: 371-81.
- 45 Silva LJ. Modelo de Vigilância Epidemiológica em el Estado de São Paulo. *Rev Pat Trop.* 2001; 30: 51-2.
- 46 Secretaria de Estado da Saúde – Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Relatório do Grupo de Estudo do Programa de Controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo, 1989.
- 47 Lorosa ES, Andrade RE, Pujol-Luz JR, Jurberg J, Carcavallo RU. Determinação das fontes alimentares e da infecção natural do *Triatoma jurbergi* (Carcavallo, Galvão & Lent, 1998), *Triatoma vanda* (Carcavallo, Galvão, Noireau & Lent, 2001), capturados no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Bras Zociênc Juiz de Fora.* 2003; 5: 253-65.
- 48 Luz ZMP, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994; 27: 146-8.
- 49 Portela-Lindoso AAB & Shikanay-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública.* 2003; 37(1): 107-15.

- 50 Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbel DA, Romanha AJ. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South América: an overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 203-9.
- 51 Machado EMM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. A Simplified Method for Sample Colletion and DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in Triatomine Vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95(6): 863-6.
- 52 Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Specie specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 1999; 72: 203-12.
- 53 Chioccola VLP. Diagnóstico molecular das Leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no estado de São Paulo. Bol Epidemiol Paulista. 2009; 6(68): 4-13.
- 54 Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. Int Rev Cytol. 1986; 99: 119-79.
- 55 Ray DS. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. Mol Cell Biol. 1989; 9: 1365-7.
- 56 Sturm N, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas's disease. Mol Biochem Parasitol. 1989; 33: 205-14.
- 57 Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Milikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates, diagnosis of chronic Chagas'disease. Mol Biochem Parasitol. 1991; 48: 211-22.
- 58 Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, *et al.* Comparison of Polymerase Chain Reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68(5): 574-82.
- 59 Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1171-5.

- 60 Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27: 1477-82.
- 61 Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. Am J Trop Med Hyg. 1992; 46: 616-23.
- 62 Carriazo CS, Sembaj A, Aguerri AM, Requena JM, Alonso C, Bua J, *et al.* Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998; 30: 183-6.
- 63 Grisard, EC. Estudo da variabilidade do gene do mini-exon e produção de cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 [Tese]. Belo Horizonte (MG). Universidade Federal de Minas Gerais; 1999. 206p.
- 64 Machado PE. Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular na detecção de *Leishmania spp* em amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Santa Catarina [Dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2004. 81p.
- 65 Araújo FMG, Bahia MT, Magalhães NM, Martins-Filho OA, Veloso VM, Carneiro CM, *et al.* Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. Acta Tropica. 2002; 81: 21–31.
- 66 Andrade ES. Infecções causadas por hematozoários em cães e gatos de ocorrência no Brasil: semelhanças e particularidades [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007. 98p.
- 67 Acha PN, Szyfres B. Enfermedad de Chagas. In: Zoonosis y Enfermedades Trasmisibles Comunes al Hombre y a los animales. 2.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. 1989. 989p.
- 68 Chiari E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(Suppl 1): 299-300.

- 69 Ávila HA, Pereira JB, Thieman O, De Paiva E, Degraeve W, Morel CM, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimen of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(9): 2421-6.
- 70 Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51: 771-7.
- 71 Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib, HW, *et al.* Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *The Transac of the Roy Soc of Trop Med & Hyg.* 1992; 86(6): 505-7.
- 72 Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53(3): 251-5.
- 73 Lachaud L, Machergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 210-5.
- 74 Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22: 19-23.
- 75 Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 205-10.
- 76 Chiari E, Brenner Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1966; 8: 134-8.
- 77 Fernandes AJ, Diotaiuti L, Azeredo BVM, Busek SU, Chiari E. Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condições de campo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995; 28: 123.

- 78 Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas – 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan S.A. 2000. p. 344-78.
- 79 Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sanches N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* em el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. Rev Bras Biol. 1998; 48: 577-87.
- 80 Rubio M. Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. Bol Chil Parasitol. 1956; 11: 62-8.
- 81 Mourão OG, Mello OC. Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1975; 9: 183-8.
- 82 Pífano CF. El diagnostico parasitológico de la enfermedad da Chagas crônica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y lãs inoculaciones experimentales em animales sensibles. Arch Venezol Patol y Parasit Med. 1954; 2: 120-55.
- 83 Barbosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL. Tentativa de isolamento primário de *Trypanosoma cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura - agentes bloqueadores. Rev Patol Trop. 1983; 12: 155-63.
- 84 Minter-Goedbloed E, Minter DM, Marshall TFC. Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. Trans Rev Soc Trop Med Hyg. 1978; 72: 217-25.
- 85 Mott KE, França JT, Barret TV, Hoff R, Oliveira TS, Sherlock IA. Cutaneous allergic reactions to *Triatoma infestans* after xenodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1980; 75: 3-10.
- 86 Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvao LM, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol. 1998; 88: 28-33.

- 87 Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, *et al.* Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Inter J Parasitol.* 2008; 38: 1533–43.
- 88 Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonreactive hybridization. *Exp Parasitol.* 1995; 81: 462-71.
- 89 Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, Castro JA, Cunha RV, Costa W, Junqueira AC. Morbidade da doença de Chagas em áreas do sertão da Paraíba e da caatinga do Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 29: 197-205.
- 90 Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. *Rev Soc Bras Malariol Doenç Trop.* 1984; 36: 15-312.
- 91 Silveira AC, Vinhaes M. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(Suppl. 2): 15-60.
- 92 Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2009; 29(2): 150-2.
- 93 Lauricella MA, Sinagra AJ, Paulone I, Riarte AR, Segura EI. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of Argentine Republic. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1989; 31: 63-70.
- 94 Ruiz AM, Wisnivesky-Colli C, Gurtler RE, Lazzari J, Bujas AM, Segura EL. Estudio sobre la prevalencia de la tripanosomiasis Americana en Argentina. *Infección em humanos y animales domésticos em um caserío Del Noroeste de Córdoba. Medicina (Buenos Aires)* 1984.
- 95 Pífano CF, Benaim Pinto H, Medina R, Romar M, Domínguez E. Estado actual de las investigaciones sobre enfermedad de Chagas em el Valle de Yaracuy, Venezuela. *1ª Reun Panam Enf Chagas,* 1949; 1: 91-5.

- 96 Valdivia J, Valdivia O. Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas em el Departamento de Santa Cruz, Bolivia. In “Enfermedad de Chagas”. Romero A. ed., Los amigos del libro, La Paz, Bolivia, 1978; 105-14.
- 97 Wisniveski-Colli C, Gurtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Segura EL. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1985; 27: 346-52.
- 98 Pompilio MA, Dorval MEMC, Cunha RV, Britto C, Borges-Pereira J. Aspectos epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença de Chagas em Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(6): 473-8.
- 99 Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Situação epidemiológica. Aspectos epidemiológicos. Brasília; 2009a [Cited 2009 Oct 29] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454
- 100 Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Descrição da doença. Brasília; 2009b [Cited 2009 Oct 29] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31114
- 101 Chagas C. Papel do tatu (*Tatusia novemcincta*) na transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Rev Méd Cir do Brasil. 1918; 26: 220-3.
- 102 Neiva A, Pinto C. Representantes dos gêneros *Triatoma lap*, *Rhodnius stal* encontrados no Brasil Central e Sul; observações biológicas e descrição de uma nova espécie. Brasil Méd. 1923; 37: 84-6.
- 103 Silva RP. Estudo sobre *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) em área de Mato Grosso do Sul: casos humanos, reservatórios e transmissores [Tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1979.
- 104 Aguiar JI, Aguiar ES. Serologic testing for Chagas` disease and HIV in counseling programs and blood Banks in Midwest Brasil. Braz J Infec Dis. 1999; 3: 176-9.

- 105 Castro CN. Influência da parasitemia no quadro clínico da doença de Chagas. Rev Pat Trop. 1980; 9: 73-136.
- 106 Borges-Pereira J, Coura JR. Morbidade da doença de Chagas. Estudo seccional em uma área endêmica, Virgem da Lapa, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 1986; 19: 139-48.
- 107 Aguiar JI, Siufi Junior P, Cunha RV, Paniago A, Petengil L, Pompilio M, et al. Prevalência da infecção chagásica em primodoadores de sangue – Campo Grande/MS. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31(Suppl 1): 215.
- 108 Borges-Pereira J, Coura JR. Morbidade da doença de Chagas em populações urbanas do Sertão da Paraíba. Rev Soc Bras Med Trop. 1987; 20: 101-7.
- 109 Pompilio MA, Paniago AMM, Borges-Pereira J, Silva FAD, Silva RCB, Lima JHF. Análise clínica-epidemiológica de 200 casos de doença de Chagas atendidos no HU-UFMS de 1986-1996. Ver Soc Bras Med Trop. 1998; 31(Suppl 1): 214.
- 110 Neiva A. Informações sobre a biologia do *Conorhius megistus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1910; 2: 206-12.
- 111 Neiva A. Notas de Entomologia médica e descrição de duas espécies de triatomas norte-americanos. Bras Med. 1912; 26: 21-2.
- 112 Bayma T. Moléstia de Chagas (nota sobre a verificação parasitológica no homem, em São Paulo. Rev Med São Paulo. 1914; 17: 3.
- 113 Carini A, Maciel J. Existência da Moléstia de Chagas no Estado de São Paulo. Ann Paul Med Cir. 1914a; 2: 75-7.
- 114 Carini A, Maciel J. Distribuição dos triatomas no Estado de São Paulo. Ann Paul Med Cir. 1914b; 2: 78-9.
- 115 Vilela E. Forma aguda da doença de Chagas. Primeira verificação no Estado de São Paulo. Bras Med. 1918; 32: 65.
- 116 Gomes FJ. Triatomas e Moléstia de Chagas no Estado de São Paulo. Colet Trab Inst Butantan (1901 – 1907). 1918; 403-26.

- 117 Rosenfeld G, Cardoso FA. Distribuição dos triatomíneos e de moléstia de Chagas no Estado de São Paulo (Brasil). Rev Clín São Paulo. 1914; 9: 198-209.
- 118 Pessoa SB. Problemas Brasileiros de Higiene Rural. São Paulo: Renascença 1948. 582p.
- 119 Freitas JLP. Dados atuais sobre a distribuição de triatomíneos e moléstia de Chagas no Estado de São Paulo. Rev Paul Med. 1950; 37: 227-36.
- 120 Silva EOR, Guarita OF, Ishihata GK. Doença de Chagas: Atividades de controle dos transmissores no Estado de São Paulo. Rev Bras Malariol. 1987; 31: 99-119.
- 121 Godoy I. Soroprevalência da infecção chagásica em moradores em municípios da Direção Regional de Saúde XI do Estado de São Paulo [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2003. 150p.
- 122 Lucheis SB. Tripanossomatídeos em cães de pacientes chagásicos crônicos, habitantes de Botucatu (SP) e região, avaliados pelos métodos de xenodiagnóstico artificial, hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* e/ou *Trypanosoma rangeli* [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2005. 113p.
- 123 Lima-Júnior MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio de Reação em Cadeia da Polimerase. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(3): 303-8.
- 124 Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, Miranda AB, Lopes UG, Degrave WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(3): 279-84.
- 125 Silber AM, Bua J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. Exp Parasitol. 1997; 85(3): 225-32.

- 126 Veas F, Breniere SF, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol.* 1991; 37(1): 73-84.
- 127 Barr SC, Greene CE, Matete G. Trypanosomiasis. In: Greene CE. *Infectious diseases of dog and cat.* 3.ed. St. Louis: Saunders; 2006. p. 445-50.
- 128 Fernandes A, Chiari E, Casanova C, Dias JC, Romanaha AJ. The threat of reintroduction of natural transmission of Chagas's disease in Bambuí, Minas Gerais state, Brazil, due to *Panstrongylus megistus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87(2): 285-9.
- 129 Amóra SSA. *Epidemiologia da Leishmaniose e Tripanossomíase Canina no Município de Mossoró [Dissertação].* Fortaleza (RN): Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; 2004. 90p.

9 – ANEXOS

9.1 – Anexo 1: Preparo do meio LIT (Liver Infusion Tryptose).

Para o preparo de 250 mL desse meio, foram colocados em um Kitassato estéril 2 g de Na_2HPO_4 (Nuclear[®]), 1 g de NaCl (Synth[®]), 0,1 g de KCl (Dinâmica[®]) e 44,5 mL de água Mili-Q. Um suporte de aço para filtro (Millipore[®]), com membrana de 22 μm de poro (Millipore[®]) foi adaptado ao Kitassato, vedado com papel alumínio e papel manilha e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Simultaneamente, foram diluídos 0,75 g de infusão de fígado (Difco[™]) em 100 mL de água Mili-Q aquecida, 0,5 g de Dextrose (Oxoid[®]) e 1,25 g de Triptose (Vetec[®]), acertando-se o pH da solução em 7,4. Essa diluição foi filtrada no Kitassato que estava acoplado a uma bomba a vácuo. Posteriormente, foram filtrados 5,5 mL de hemoglobina Bovina a 2,2% (BBL[™]). Na capela de fluxo laminar, em condições estéreis, foram acrescentados 30 mL de Soro Fetal Bovino a 11% (Nutricell[®]) e 1 mL (20 mg) de gentamicina (Gentocin[®]). Por último, foi realizado controle de esterilidade, por 48h em estufa a 37°C, utilizando o meio BHI. O conteúdo final foi distribuído em tubos estéreis e com tampa com rosca, mantidos em estufa a 28°C - 30°C até o momento do uso.

9.2 – Anexo 2: Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp-SP.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 611 sobre o Projeto de Pesquisa “Hemocultura e Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para a doença de Chagas” a ser conduzido por Luciano José Eloy, orientado pela Prof^ª. Dr^ª. Simone Baldini Luchies, com a colaboração do Prof. Dr. Hélio Langoni, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva que os “cães e gatos” são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 28 de junho de 2.007


Prof^ª Dr^ª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

10 - APÊNDICES

10.1 – Apêndice 1: Lista com os resultados das hemoculturas e PCR referentes aos 100 animais de Botucatu-SP.

CÃES	HEMOCULTURA	PCR - P35/36	PCR - TCZ1/2	GATOS	HEMOCULTURA	PCR - P35/36	PCR - TCZ1/2
1	negativa	negativa	negativa	1	negativa	negativa	negativa
2	negativa	negativa	negativa	2	negativa	negativa	negativa
3	negativa	negativa	negativa	3	negativa	negativa	negativa
4	negativa	negativa	negativa	4	negativa	negativa	negativa
5	positiva	negativa	negativa	5	negativa	negativa	negativa
6	positiva	negativa	negativa	6	negativa	negativa	negativa
7	negativa	negativa	negativa	7	negativa	negativa	negativa
8	negativa	negativa	negativa	8	negativa	negativa	negativa
9	positiva	negativa	negativa	9	negativa	negativa	negativa
10	negativa	negativa	negativa	10	negativa	negativa	negativa
11	negativa	negativa	negativa	11	negativa	negativa	negativa
12	negativa	negativa	negativa	12	negativa	negativa	negativa
13	negativa	negativa	negativa	13	negativa	negativa	negativa
14	negativa	negativa	negativa	14	negativa	negativa	negativa
15	negativa	negativa	negativa	15	negativa	negativa	negativa
16	negativa	negativa	negativa	16	negativa	negativa	negativa
17	negativa	negativa	negativa	17	negativa	negativa	negativa
18	negativa	negativa	negativa	18	negativa	negativa	negativa
19	negativa	negativa	negativa	19	negativa	negativa	negativa
20	negativa	negativa	negativa	20	negativa	negativa	negativa
21	negativa	negativa	negativa	21	negativa	negativa	negativa
22	negativa	negativa	negativa	22	negativa	negativa	negativa
23	negativa	negativa	negativa	23	negativa	negativa	negativa
24	negativa	negativa	negativa	24	negativa	negativa	negativa
25	negativa	negativa	negativa	25	negativa	negativa	negativa
26	negativa	negativa	negativa	26	negativa	negativa	negativa
27	negativa	negativa	negativa	27	negativa	negativa	negativa
28	negativa	negativa	negativa	28	negativa	negativa	negativa
29	positiva	negativa	negativa	29	negativa	negativa	negativa
30	negativa	negativa	negativa	30	negativa	negativa	negativa
31	negativa	negativa	negativa	31	negativa	negativa	negativa
32	negativa	negativa	negativa	32	negativa	positiva	positiva
33	negativa	negativa	negativa	33	negativa	positiva	positiva
34	negativa	negativa	negativa	34	negativa	negativa	negativa
35	negativa	negativa	negativa	35	negativa	positiva	positiva
36	negativa	negativa	negativa	36	negativa	positiva	positiva
37	negativa	negativa	negativa	37	negativa	positiva	positiva
38	negativa	negativa	negativa	38	negativa	positiva	positiva
39	negativa	negativa	negativa	39	negativa	positiva	positiva
40	negativa	positiva	positiva	40	negativa	positiva	positiva
41	negativa	positiva	positiva	41	negativa	positiva	positiva
42	negativa	positiva	positiva	42	positiva	negativa	negativa
43	negativa	positiva	positiva	43	negativa	negativa	negativa
44	negativa	positiva	positiva	44	negativa	negativa	negativa
45	negativa	positiva	positiva	45	negativa	negativa	negativa
46	negativa	positiva	positiva	46	negativa	negativa	negativa
47	negativa	positiva	positiva	47	positiva	negativa	negativa
48	negativa	negativa	negativa	48	negativa	negativa	negativa
49	negativa	positiva	positiva	49	positiva	positiva	positiva
50	negativa	positiva	positiva	50	negativa	positiva	positiva

10.2 – Apêndice 2: Lista com os resultados das hemoculturas e PCR referentes aos 100 animais de Campo Grande-MS.

CÃES	HEMOCULTURA	PCR - P35/36	PCR - TCZ1/2	GATOS	HEMOCULTURA	PCR - P35/36	PCR - TCZ1/2
1	negativa	negativa	negativa	1	negativa	negativa	negativa
2	negativa	negativa	negativa	2	negativa	negativa	negativa
3	negativa	negativa	negativa	3	negativa	negativa	negativa
4	negativa	negativa	negativa	4	negativa	negativa	negativa
5	negativa	negativa	negativa	5	negativa	negativa	negativa
6	negativa	negativa	negativa	6	negativa	negativa	negativa
7	negativa	negativa	negativa	7	negativa	negativa	negativa
8	negativa	negativa	negativa	8	negativa	negativa	negativa
9	negativa	negativa	negativa	9	negativa	negativa	negativa
10	negativa	negativa	negativa	10	negativa	negativa	negativa
11	negativa	negativa	negativa	11	negativa	negativa	negativa
12	negativa	negativa	negativa	12	negativa	negativa	negativa
13	negativa	negativa	negativa	13	negativa	negativa	negativa
14	negativa	negativa	negativa	14	negativa	negativa	negativa
15	negativa	negativa	negativa	15	negativa	negativa	negativa
16	negativa	negativa	negativa	16	negativa	negativa	negativa
17	negativa	negativa	negativa	17	negativa	negativa	negativa
18	negativa	negativa	negativa	18	negativa	negativa	negativa
19	negativa	negativa	negativa	19	negativa	negativa	negativa
20	negativa	negativa	negativa	20	negativa	negativa	negativa
21	negativa	negativa	negativa	21	negativa	negativa	negativa
22	negativa	negativa	negativa	22	negativa	negativa	negativa
23	negativa	negativa	negativa	23	negativa	negativa	negativa
24	negativa	negativa	negativa	24	negativa	negativa	negativa
25	negativa	negativa	negativa	25	negativa	negativa	negativa
26	negativa	negativa	negativa	26	negativa	negativa	negativa
27	negativa	negativa	negativa	27	negativa	negativa	negativa
28	negativa	negativa	negativa	28	negativa	negativa	negativa
29	negativa	negativa	negativa	29	negativa	negativa	negativa
30	negativa	negativa	negativa	30	negativa	negativa	negativa
31	negativa	negativa	negativa	31	negativa	negativa	negativa
32	negativa	negativa	negativa	32	negativa	negativa	negativa
33	negativa	negativa	negativa	33	negativa	negativa	negativa
34	negativa	negativa	negativa	34	negativa	negativa	negativa
35	negativa	negativa	negativa	35	negativa	negativa	negativa
36	negativa	negativa	negativa	36	negativa	negativa	negativa
37	negativa	negativa	negativa	37	negativa	negativa	negativa
38	negativa	negativa	negativa	38	negativa	negativa	negativa
39	negativa	negativa	negativa	39	negativa	negativa	negativa
40	negativa	negativa	negativa	40	negativa	negativa	negativa
41	negativa	negativa	negativa	41	negativa	negativa	negativa
42	negativa	negativa	negativa	42	negativa	negativa	negativa
43	negativa	negativa	negativa	43	negativa	negativa	negativa
44	negativa	negativa	negativa	44	negativa	negativa	negativa
45	negativa	negativa	negativa	45	negativa	negativa	negativa
46	negativa	negativa	negativa	46	negativa	negativa	negativa
47	negativa	negativa	negativa	47	negativa	negativa	negativa
48	negativa	negativa	negativa	48	negativa	negativa	negativa
49	negativa	negativa	negativa	49	negativa	negativa	negativa
50	negativa	negativa	negativa	50	negativa	negativa	negativa

11 – ARTIGO ENVIADO PARA A REVISTA PARASITOLOGY RESEARCH

List of authors and their affiliations:

Luciano Jose Eloy^{a,*}, Simone Baldini Lucheis^b

^aDepartamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB),
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito
de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brazil

^bAgência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA - Pólo Centro Oeste,
Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brazil

*Corresponding author. Tel. +55 14 9746-2217

E-mail address: ljeloy@yahoo.com.br (Eloy LJ)

Title: Evaluation of the hemoculture technique by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2 for detection of *Trypanosoma cruzi* in dogs and cats

Abstract

Chagas disease is a zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Dogs and cats participate actively in this parasite's transmission cycle. This study aimed at evaluating the occurrence of *T. cruzi* in dogs and cats from Botucatu-SP and Campo Grande-MS as well as at evaluating the technique of hemoculture in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium by Polymerase Chain Reaction (PCR), in addition to comparing primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2 in *T. cruzi* detection. Blood samples were collected from 50 dogs and 50 cats in Campo Grande-MS and from 50 dogs and 50 cats in Botucatu-SP. For hemoculture, the samples were inoculated in LIT medium, and readings were performed for four months. Upon completion of such period, all the hemocultures were processed for parasitic DNA extraction. The PCR reactions were performed by using primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2. Of the samples from Botucatu-SP, ten dogs and ten cats (20%) were positive to PCR (using the two pairs of primers), and four dogs and three cats (7%) were positive to hemoculture. All the samples from Campo Grande-MS exhibited a negative result for both techniques. Results showed that PCR presented higher sensitivity for diagnosing Chagas disease, that primers TCZ1/TCZ2 confirmed the diagnostic positivity for *T. cruzi* shown by primers P35/P36 and that the cats from Botucatu-SP are playing the role of household reservoirs of this parasite, which reinforces the need for constant epidemiologic surveillance for this zoonosis not only in Botucatu-SP, but also in Campo Grande-MS.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, dogs, cats, Polymerase Chain Reaction (PCR)

1 – Introduction

Chagas disease (CD) is an important zoonosis, and its etiologic agent is the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Souza 2000).

CD is dispersed from Mexico to Patagonia and has infected from 16 to 18 million individuals, showing various morbi-mortality patterns. There are also 100 million people living in risk areas (Rosypal 2007).

In Brazil, the infection is found in all regions (Dias 1987), and it is estimated that six million people are infected with *T. cruzi*, in addition to 25 million individuals who live in risk areas. It is also estimated that 33 thousand new cases of the disease are found each year (Souza et al. 2008).

Primitively, CD was an enzootic disease as it affected only wild mammals and birds. Recently, this disease has become urban, particularly as a result of increased rural emigration, ecological imbalance and the increased number of blood transfusions (Rosypal 2007). Hence, *T. cruzi* began to infect humans and susceptible household animals, such as dogs and cats, thus making CD a typical zoonosis (Da Silva 2001).

Dogs and cats infected with *T. cruzi* act as infection sources for humans and other animals, thus being important reservoirs of trypanosomatids among household animals (Gurtler 2007).

Trypanosoma rangeli (*T. rangeli*) can infect various mammal species, including humans, thus adding to the infection by *T. cruzi* and also affecting triatomid vectors (D'alessandro and Hincapie 1986). In Brazil, the presence of *T. cruzi* and *T. rangeli* has been detected in naturally infected dogs (Ramirez et al. 1998).

Differently from *T. cruzi*, *T. rangeli* is considered to be pathogenic only for triatomid insects, being harmless to vertebrate hosts, such as humans and dogs (Torres 2008). The simultaneous presence of these parasites in the same geographic region allows for mixed infection in vertebrate and invertebrate hosts (Pifano et al. 1948).

Hemoculture, which consists in the enrichment of a blood sample, thus enabling the multiplication of existing parasites, represents an indirect parasitological test used in the chronic phase of CD, whose positivity shows the presence of the parasite in the blood stream. This is an important difference in relation to the PCR technique, which can detect parasite fragments and does not require the presence of whole organisms in the blood stream (Lucheis et al. 2005).

Although the detection of infections with *T. cruzi* and *T. rangeli* is based on the same serological and parasitological assays, such as hemoculture, none of these methods can specifically detect such trypanosomes (Machado et al. 2000).

Some authors have used molecular assays with the purpose to identify and classify these parasites. In this group of protozoans, one of the most frequently studied structures has been the kinetoplast, which is constituted by a DNA-rich region contained in a mitochondrion (kDNA). It is present in all flagellates belonging to the order Kinetoplastida, including *T. cruzi* and *T. rangeli*. kDNA represents approximately 25% of the flagellate's whole DNA, and it is structurally formed by a network of two-sized interconnected circular molecules known as maxicircles and minicircles (Chioccola 2009). Among trypanosome species, the kDNA minicircle molecules are heterogeneous in relation to the nucleotide sequence, thus enabling the distinction between species by the molecular analysis of such component. On the other hand, the existence of heterogeneous regions interlaid with

highly homogeneous regions in relation to nucleotide sequence, arrangement and position in the molecules has been shown within the same species (Ray 1989; Sturm et al. 1989).

For *T. cruzi*, the amplification of the kDNA minicircle variable region by the use of P35/P36 primers produces the characteristic band of 330 base pairs (bp) and enables the detection of an equivalent to one millionth of the parasite's single cell (Sturm et al. 1989; Ávila et al. 1991). Nevertheless, kDNA of *T. rangeli* can be amplified with the same pairs of primers, thus producing a product of 760 bp and additional bands ranging from 300 to 450 bp. This is possible due to the similarity in the sequence of nitrogen bases in specific annealing sites of the primers that are common to *T. cruzi* and *T. rangeli*. The size similarity of fragments of the two trypanosomes hinders the use of such approximation in the analysis of single and mixed infections (Vallejo et al. 1999).

Virreira et al. (2003), In a study on blood samples from newborns to mothers infected with *T. cruzi*, tested various pairs of primers which amplified parasitic DNA and concluded that the sensitivity of the pair of primers TCZ1/TCZ2 (which shows fragments of 188 bp) is tenfold that of pair P35/P36 (Kirchhoff et al. 1996). Additionally, primers TCZ1/TCZ2 are capable of amplifying all *T. cruzi* lineages (Carriazo et al. 1998) and of not amplifying the DNA of another trypanosome (Moser et al. 1989).

Primers TCZ1/TCZ2 amplify a repetitive sequence of a microsatellite region of the nuclear DNA (nDNA) of *T. cruzi* (Moser et al. 1989). This region is the mini-exon gene, which presents a nuclear location that is relatively conserved among species of the same genus, showing distinct nucleotide sizes and sequences even among very close species (Araújo et al. 2002).

Hence, the present work aimed at studying the occurrence of *Trypanosoma cruzi* in cats and dogs from the cities of Botucatu-São Paulo (SP) and Campo Grande-Mato Grosso do Sul (MS) as well as at evaluating the hemoculture technique in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium by the Polymerase Chain Reaction (PCR), in addition to comparing the diagnostic efficiency between the pairs of primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2 in *T. cruzi* detection.

2 - Material and methods

2.1- Material

Two hundred animals were used, of which 100 were from Botucatu-SP (50 dogs and 50 cats) and 100 were from Campo Grande-MS (50 dogs and 50 cats).

2.2 – Blood samples and collection

The blood samples were randomly collected at the Zoonosis Control Center (CCZ) in the city of Campo Grande-MS and at the Municipal Kennel and Animal Protection Association (APA) of Botucatu-SP. 5 mL to 8 mL of blood were collected from each animal by means of a jugular venous puncture using tubes containing EDTA. The samples were cooled and then sent to the laboratory, where they were immediately processed for hemoculture.

2.3 – Sample processing and hemoculture technique performance

The processing of the samples collected from the animals at the Municipal Kennel of APA in Botucatu-SP and the later performance of the hemoculture technique occurred at the Center for Zoonosis Research – NUPEZO of the Department of Veterinary Hygiene and Public Health of the Botucatu School of Veterinary

Medicine and Animal Husbandry - UNESP in São Paulo state. As regards the animals from the Zoonosis Control Center of Campo Grande-MS, the samples for hemoculture were processed at the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of Mato Grosso do Sul Federal University - UFMS, Campo Grande-MS, and the hemoculture technique was performed in the Laboratory of Tropical Diseases of the Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis of the Botucatu School of Medicine – UNESP in São Paulo state.

2.4 – Hemoculture in LIT medium

The medium used for blood culture was Liver Infusion Tryptose (LIT). In order to prepare 250 mL of this medium, 2 g of Na₂HPO₄ (Nuclear[®]), 1 g of NaCl (Synth[®]), 0.1 g of KCl (Dinâmica[®]) and 44.5 mL of Milli-Q water were placed in a sterile Kitasato flask. A stainless-steel filter holder (Millipore[®]), with a membrane whose pore size was 22 µm (Millipore[®]), was adapted to the Kitasato flask, sealed with aluminum foil and manilla paper and autoclaved at 121°C for 20 minutes. Simultaneously, 0.75 g of liver infusion (DifcoTM) were diluted in 100 mL of heated Milli-Q water, 0.5 g of Dextrose (Oxoid[®]) and 1.25 g de Tryptose (Vetec[®]), setting the solution pH at 7.4. Such dilution was filtered in the Kitasato flask, which was coupled to a vacuum pump. Later, 5.5 mL of Bovine hemoglobin were filtered at 2.2% (BBLTM). In the laminar flow hood, 30 mL of Fetal Bovine Serum at 11% (Nutricell[®]) and 1 mL (20 mg) of gentamicin (Gentocin[®]) were added in sterile conditions. Finally, sterility control was performed in a sterilizer at 37°C for 48 h using BHI medium. The final content was distributed in sterile tubes with threaded caps and maintained in a stove at 28°C - 30°C until the moment of use.

For every blood sample collected, three sterile threaded tubes, each containing five mL of the sterile LIT medium, were separated. The blood samples were handled in a laminar flow hood, which had been previously cleaned with 70° alcohol and maintained under the action of ultraviolet light for 20 minutes. By using a 1-mL sterile syringe, the plasma portion was removed and slowly transferred to the first tube. This procedure was repeated for the leukocyte portion (located between plasma and the red-cell sediment), which was transferred to the second tube, and similarly for the red-cell sediment, which was transferred to the third tube. Next, the cultures were incubated and maintained in a stove at 28°C - 30°C up to four months after inoculation, and then submitted to the Polymerase Chain Reaction technique (PCR) for *T. cruzi* and/or *T. rangeli*.

2.5 – Hemoculture reading

The first reading was performed in a laminar flow hood ten days after the inoculation of the first sample by removing five microliters from each tube of inoculated culture and placing it between a slide and coverslip. Five slides per tube were read. Observation was performed on a light microscope at 1.000X magnification using immersion oil. The cultures were observed fortnightly for four months. The positive cultures were immediately processed for extraction of the parasitic DNA. The negative cultures were also processed upon completion of the four-month period of reading follow-up.

2.6 – Preparation of blood samples in LIT medium for parasitic DNA extraction

Both the positive and negative cultures were separately washed in sterile Phosphate Buffered Saline solution, 0,01M (pH 7.2) and centrifuged at 1,000 rpm for 10 minutes, and the sediment was stored in sterile DNase- and RNase-free tubes at -20°C until the moment of use for parasitic DNA extraction (Portela-Lindoso and Shikanay-Yasuda 2003).

2.7 – DNA extraction

DNA was extracted from 300 μL of the stored sediment by using Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®). It was later stored in sterile DNase- and RNase-free microtubes and maintained at -20°C until the moment of PCR performance.

2.8 – Polymerase Chain Reaction for *Trypanosoma cruzi* and/or *Trypanosoma rangeli*

The reactions for the samples from Botucatu-SP and Campo Grande-MS were performed in duplicate, containing 2.5 μL of PCR buffer (50mmol KCl, 10 mmol of Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2), 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.0 U of *Taq*-polymerase, 10 pmol of each primer, 2 μL of DNA and 17.8 μL of ultrapure water for a final volume of 25 μL .

Primers P35 (5' - AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA - 3') and P36 (5' - GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT - 3') were used for amplifying the fragments of 330-bp kDNA minicircles, according to Sturm et al. 1989.

The conditions of amplification in a thermocycler (Mastercycler Personal - Eppendorf®) occurred according to Vallejo et al. (1999), as follows: one cycle for initial denaturation at 96°C for 2 minutes; denaturation, attachment of primers and lengthening with 30 cycles for one minute each at 94°C , 60°C and 72°C , respectively; and one cycle at 72°C for 10 minutes for final extension.

2.9 – Polymerase Chain Reaction to differentiate *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*

Considering that the primers used in PCR, P35/P36, are not specific for *T. cruzi*, since they amplify kDNA minicircles of that trypanosomatid as well as of *T. rangeli* (Vallejo et al. 1999), primers TCZ1 (5' - CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT - 3') and TCZ2 (5' - CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3') were used for diagnostic confirmation, as they are species-specific for *T. cruzi* and amplify an nDNA microsatellite region of 188 base pairs (Moser et al. 1989; Virreira et al. 2003).

The reactions were performed in duplicate, containing 2,5 μL of PCR buffer (50 mmol KCl, 10 mmol of Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2), 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.0 U of *Taq*-polymerase, 10 pmol of each primer, 2 μL of DNA and 17.8 μL of ultrapure water for a final volume of 25 μL .

The conditions of amplification in a thermocycler (Mastercycler Personal - Eppendorf®) occurred according to Vallejo et al. (2003), as follows: one cycle for initial denaturation at 94°C for 5 minutes; 35 cycles for denaturation at 94°C for 20 seconds, attachment of primers at 57°C for 10 seconds and lengthening at 72°C for 30 seconds and one cycle of 72°C for seven minutes for final extension respectively; and one cycle at 72°C for 10 minutes for final extension.

The 10- μL aliquots of the samples amplified by using primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2 were homogenized with 2 μL of bromophenol blue solution, submitted to horizontal agarose gel electrophoresis at 10% in 10X tris-borate-EDTA (TBE) buffer and stained by Gelred™ (Biotium, Inc®) for identification of the amplified products. The run was performed by using the same TBE buffer at 80 volts for 100 minutes, and the bands were viewed on an ultraviolet transilluminator (Benchtop M-20 - UVP®). The brand of the electrophoresis chamber used was Uniscience®.

The *T. cruzi* Y strain was used as a positive control, MIX-PCR as negative control, and 3 μL of DNA Ladder (NORGEN®) 100 bp were utilized as a molecular weight standard.

2.10 – Animal Experimentation Ethics Committee

This study was submitted to the Animal Experimentation Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine - UNESP and approved on June 28, 2007.

3 – Results

3.1 – Animals from Botucatu-SP

3.1.1 - Hemoculture

Of the 50 dogs, four samples (8%) showed viable parasites in the culture and, of the 50 samples from cats, parasitic forms were observed in three (6%) (**Figure 1**).

Among the dogs, one sample was diagnosed in the first reading (10 days after inoculation), two were found 25 days after inoculation and one after 40 days. In the group of cats, the positive samples were diagnosed in the first reading.

As concerns the positive dogs, one sample was related to the leukocyte portion, and the other three to the red-cell sediment portion. Among the positive cats, all the samples were of red-cell sediment.

3.1.2 – Polymerase Chain Reaction (PCR) for *T. cruzi* and/or *T. rangeli* using primers P35/P36

Of the 50 dogs evaluated, ten (20%) were positive, and as regards the 50 cats, ten (20%) showed amplified products of 330 base pairs (bp) in length, corresponding to the amplification of the fragment containing a specific region of the kDNA minicircle of *T. cruzi* and/or *T. rangeli* (**Figure 2**) (Vallejo et al. 1999).

3.1.3 – Polymerase Chain Reaction (PCR) for *T. cruzi* using primers TCZ1/TCZ2

All the hemocultures for the 100 animals from Botucatu - SP were again submitted to PCR using primers TCZ1/TCZ2, which amplify products of 188 base pairs (bp) in length, corresponding to the fragment that contains a specific microsatellite region of *T. cruzi* DNA. Only the 20 samples for the ten dogs and ten cats that were positive for *T. cruzi* and/or *T. rangeli* to PCR using primers P35/P36 also were positive to PCR when using TCZ1/TCZ2, thus confirming chagasic infection in these animals (**Figure 3**) (Virreira et al. 2003).

Of the 100 animals evaluated, only one cat (1%) tested positive for both the hemoculture technique and PCR (**Table 1**).

The statistical analysis showed that the hemoculture technique has low sensitivity - 14% (0.14) and high specificity - 89% (0.89) to identify tripanosomatids. That postulation is confirmed by the Positive Likelihood Ratio (1.64), showing that hemoculture identifies many false negatives, 64%, and by the Negative Likelihood Ratio (1.04), showing that hemoculture has 96% of chances to identify negatives, that is, it identifies almost only negatives.

Additionally, the Positive Predictive Value (0.05) shows that the hemoculture technique has small capacity to predict positives, only 5%, and the Negative Predictive Value (0.92) shows that the technique has great capacity to predict negatives - 92%.

The Kappa coefficient was estimated separately for dogs and cats, and 0.12 and 0.14 were found for dogs and cats, respectively. These results showed the small agreement between the hemoculture and PCR techniques.

According to the Fit of the Logistic Regression Model for positive *T. cruzi* diagnosis, a significant difference was found between the PCR and hemoculture techniques. It was observed that PCR detects 3.3 times (OR=3.332, CI of 95% and p-value=0.0098) as many positive dogs and/or cats in relation to hemoculture.

3.2 – Animals from Campo Grande-MS

All the hemocultures and PCR reactions (for primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2) showed negative results.

4 – Discussion

According to the Health Surveillance Department of the Health Ministry, the endemic area, or more precisely the area posing risk of vector transmission of Chagas disease in Brazil, currently covers 18 states, among which are Mato Grosso do Sul and São Paulo states (Secretaria de Vigilância em Saúde 2009).

In São Paulo state, it is considered that Chagas disease transmission by *T. infestans* has been interrupted since the early 1970s. In the micro regions of Itapetininga and Avaré, transmission was considered to be interrupted in 1974 because, since then, few triatomids, among those captured, were infected (Wanderley 1993). In case a “residual transmission” has occurred after these years, it must have taken place in a restricted area in the region of Sorocaba and in cities belonging to the micro regions of Avaré e Itapetininga (Godoy 2003).

Godoy (2003) studied evidence of *T. cruzi* vector transmission after 1983 in the houses and peridomiciliar areas of chagasic individuals residing in the region of Botucatu-SP and found that schoolchildren born from 1973 to 1983 did not show serum positivity after 1982, thus indicating the efficiency of the campaign and control against Chagas disease in this region.

However, although there is evidence that Chagas disease is controlled in the region of Botucatu-SP, the University Hospital of the Botucatu School of Medicine still provides care to many *T. cruzi*-infected individuals diagnosed by the blood center during blood donation as well as by the hospital’s various clinical and surgical specialties (Lucheis 2005).

Even in face of the reduced occurrence of the disease in São Paulo state and the region of Botucatu-SP, the 20% of positivity for *T. cruzi* shown by PCR in dogs from this municipality in this study confirm the findings by Lucheis et al. (2005). They studied a total number of 50 dogs belonging to 30 chronic chagasic individuals in the western region of São Paulo state and found 34 positive dogs (68%) to xenodiagnosis, 30 positive dogs (60%) to hemoculture and 25 positive dogs (50%) to PCR.

Of all the household mammal species serving as *T. cruzi* reservoirs, dogs and cats play the most important role in maintaining the endemic Chagas disease due to their closeness to humans, their strong susceptibility to chagasic infection and the fact that they attract the vector (Brener et al. 2000). However, since cats have the habit of remaining out of the house most of the time, dogs are considered to be the major household contributors, both qualitatively and quantitatively, in maintaining the disease’s transmission, particularly in endemic areas. They are also regarded as the major source of household food for triatomids, such as *T. infestans*, *P. megistus* and *R. neglectus*, followed by humans and birds (Fernandes et al. 1992).

The occurrence of 20% of animals infected with *T. cruzi* among the cats from Botucatu-SP evaluated in this study corroborates the results of another study conducted by Cardinal et al. (2008), which showed 4.58% positivity to PCR in 109 studied cats and concluded that they are also natural and efficient reservoirs for this protozoan. Hence, it can be speculated that the 20% of positivity to PCR for dogs and cats found in this study show that such species are playing an important role as *T. cruzi* reservoirs in the region of Botucatu-SP.

As regards the occurrence of CD in Mato Grosso do Sul, Aguiar and Aguiar (1999) found 1.1% serum positivity in first-time blood donors in Campo Grande-MS from July 1984 to February 1985, pointing out the absence of autochthonous cases.

Similarly, in a study conducted in the health district of Rio Verde-MS, in which the presence of anti-*T. cruzi* was evaluated by Indirect Immunofluorescence Reaction (IFR), Indirect Hemagglutination (HA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) in blood samples from 14,709 residing individuals (11,460 autochthonous and 3,249 allochthonous individuals), Borges-Pereira et al. (2001) found 1.83% serum positivity, among adults and children, which is a smaller percent than the 2.46% estimated for Mato Grosso do Sul state and than the 4.2% estimated for Brazil, according to the national serological inquiry performed from 1975 to 1980 (Camargo et al. 1984). Such prevalence reduction in the studied area can be explained by the success of household triatomid control measures implemented in the 1980s, which were particularly targeted at *T. infestans* (Silaveira et al. 1984). Successful control can be confirmed by the non-capture of such species in the state from 1993 to 1997 (Silveira and Vinhaes 1998).

In that study, 5.1% serum positivity was found among the allochthonous individuals, and 0.93 was observed among autochthonous residents in the Health District of Rio Verde-MS. These data can be explained by the origin of migrants, who predominantly came from the states of Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul and Paraná, with prevalence rates above the national norm of 4.2% (Borges-Pereira and Coura 1986), by the maintenance of wild niches due to environmental preservation, by the small number of favorable houses for triatomid colonization and the very biological characteristics of the major triatomid in the region, namely *T. sordida*, which is essentially peridomiciliar and has a small potential for chagasic infection transmission (Borges-Pereira et al. 2001).

On the other hand, in a study conducted from 1998 to 1999 on 120 patients with positive serology for chagasic infection attended to at Mato Grosso do Sul Federal University, in Campo Grande-MS, Pompilio et al. (2005) identified 26.1% of xenodiagnoses with positive results. These data do not differ from the percents found in endemic areas of Minas Gerais state and are greater than the 13% found for endemic areas in the hinterland of Paraíba state (Castro 1980).

Additionally, these authors found predominance of allochthonous individuals mostly from rural areas, with poor schooling and a history of intense contact with triatomids. This profile expresses the characteristics of the population of Mato Grosso do Sul, which is composed of a significant number of migrants from other regions.

Corroborating the studies by Pompilio et al. (2005), Souza et al. (2009) performed a study in which 75 blood samples of dogs from a rural area in the city of Jaraguari-MS, located 35 km to the North of the capital city Campo Grande-MS, and found a seroprevalence of 45.3% by IFR and of 24.05 by ELISA. Such values are similar to those observed in endemic regions in Argentina in 1989 (Lauricella et al. 1984) and in Costa Rica in 2002 (Monte Negro et al. 2002), thus confirming chagasic infection in the dogs from Mato Grosso do Sul.

Hence, despite the negativity for *T. cruzi* in relation to the animals from Campo Grande-MS, evaluated in the present study, it was observed that the state of Mato Grosso do Sul and the region of Campo Grande-MS showed high occurrence rates for Chagas disease (Pompilio et al. 2005).

The chronic form of the Chagas disease is characterized by a low level of parasitemia. Laboratory diagnosis in this phase can be performed by means of various techniques; however, all of them have limitations. Indirect parasitological tests, such as hemoculture, are high-specificity tests, but they cannot be regarded as gold standard as they exhibit limited sensitivity in the chronic form of the disease, which results from low and transitory parasitemia (Chiari 1999). Their sensitivity increases when the volume and number of samples is larger, when the time between collection and processing is shorter, when the LIT medium is used for culture (Portela-Lindoso and Shikanay-Yasuda 2003) and when blood samples are less intensively handled (Fernandes et al. 1995).

In the hemoculture technique, at least five slides are required per hemoculture for a definitive interpretation of a result as negative. Observers must also recognize the rapid movements of trypanosomatids so that they are not confused with other protozoans, bacteria and fungi possibly present in the hemoculture (Luquetti and Rassi 2000).

Furthermore, the accurate identification of trypanosomatids isolated only by direct observation on a microscope is rather limited and sometimes impossible to be achieved as certain development stages of some trypanosomatids are indistinguishable from each other and require identification by means of a molecular test. This is the case of *T. cruzi* and of *T. rangeli*, which cannot be identified in fresh preparations or in stained smears, thus frequently causing diagnostic errors. In this case, the specific molecular differentiation of these parasites is a necessary measure (Vallejo et al. 1998).

Since the chronic phase of the Chagas disease is also characterized by a high level of antibodies in the blood stream, some authors, such as Rubio (1956), report that the plasma and leukocyte portions of blood in humans and in various other species have shown lytic and inhibitory effects on epimastigote forms of *T. cruzi* due to the action of leukocytes and macrophages.

Despite this fact, the separation of such blood portions may also lead to the same problem due to sample handling at the moment of separation and inoculation of blood portions in the LIT medium.

Hence the low positivity in the blood cultures of animals from Botucatu-SP and the total negativity in the blood cultures of animals from Campo Grande-MS may have occurred as a result of sample handling at the moment of separation of blood portions prior to processing for the blood cultures.

Luz et al. (1994) reported 94% sensitivity with three 30-mL blood cultures in LIT medium and immediate test processing, with maximum time of 30 minutes. The blood volume recommended for blood culture is 30 mL for humans (Luz et al. 1994), however, in the case of the animals in this study, the collection of 5 mL - 8 mL per animal was standardized in order to adapt to the dogs' and cats' weight and age variability. A larger volume of inoculated blood or even a larger number of cultures per animal may have increased the sensitivity of hemoculture tests.

Minter Goedbloed et al. (1998) showed that the number of positive results for hemoculture increased when the cultures were examined longer than six months of incubation. On the other hand, in the present study, the results showed that, of the seven positive samples among the animals from Botucatu-SP, only one was diagnosed after 40 days of inoculation. This fact suggests that *T. cruzi* survival in the LIT medium may be reduced over time instead of its multiplication.

Hemoculture use is then restricted to its low sensitivity and to the long time period until the final result is achieved (Mott et al. 1980), in addition to the fact that parasite's survival in the LIT medium may decrease over time.

In the present study, the statistical analysis confirms the low sensitivity of hemoculture and the high specificity and sensitivity of PCR in *T. cruzi* detection, thus corroborating the studies by Araújo et al. (2002), who found 100% positivity for PCR and only 22% for blood culture for experimentally infected dogs in 2002.

In the present study, the negative results for all tests applied to the animals in Campo Grande-MS differ from those found by Cardinal et al. (2008). In a study conducted in the province of Santiago del Estero, in the Chaco region in Argentina, these authors evaluated the occurrence of *T. cruzi* in 697 household dogs and 109 cats by the PCR technique from 2000 to 2007. The parasite was detected in 57 dogs and in five cats. However, the Chaco region is considered to be endemic for the Chagas disease, which is not true for the region of Campo Grande-MS.

Similarly, studies in certain endemic regions have detected, by PCR, patients with 96.5% to 100% sensitivity (Barbosa et al. 1983). However, in Paraíba state, Brito et al. (1995), found only 45% positivity in blood donors' samples by using the same primers.

These data suggest regional differences, one of which would be represented by lower and transitory parasitemia in the chronic phase of the disease according to the geographic area studied. A factor that could be related to such variability would lie in the genetic difference of the isolates (Portela-Lindoso and Shikanay-Yasuda 2003).

As concerns the primers used in the present study, the detection limit of primers TCZ1/TCZ2 is at least 0.002 parasite/assay, that is, it is higher than that of other primers, such as P35/P36. Also, their sensitivity is tenfold that of primers P35/P36, which may be related to the incomplete dispersion of minicircles of the dense kinetoplast present in the blood samples (Virreira et al. 2003).

Furthermore, primers TCZ1/TCZ2 can detect a single parasite in a volume of blood of 0.1 mL. Such sensitivity is sufficient to detect infection both in the acute and chronic phases of Chagas disease (Virreira et al. 2003).

In their study, Virreira et al. (2003), tested six pairs of primers, and only the nDNA Diaz1/Diaz2 and TCZ1/TCZ2 primer pairs detected all *T. cruzi* lineages by amplifying the repetitive sequence of nuclear DNA with similar intensity. On the other hand, even if primers P35/P36 can also equally amplify all *T. cruzi* lineages, it was observed that some of the primers, among which are P35/P36, amplified only certain lineages of the parasite that resulted in fragments of different intensities (Silber et al. 1997; Carriazo et al. 1998).

5 – Conclusions

The results showed greater sensitivity for the Polymerase Chain Reaction (PCR) in diagnosing the Chagas disease, and primers TCZ1/TCZ2 confirmed the diagnostic positivity for *T. cruzi*, which was also shown by primers P35/P36. Therefore, the dogs and cats from Botucatu - SP are playing a role of household reservoirs of that parasite. This fact reinforces the need for constant epidemiological surveillance for this zoonosis, which must occur in Campo Grande-MS as well. Hence, the continuity of this study is required in order to investigate new

cases of dogs and cats infected with *T. cruzi* in the studied regions, to evaluate how such animals became infected in the region of Botucatu-SP and if, in addition to serving as reservoirs, they are also sources of infection to humans.

6 – Acknowledgements

We would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (São Paulo State Research Support Foundation) for financial support; Professor Ana Luiza Alves Osório from Mato Grosso do Sul Federal University - UFMS for laboratory support; the technical team of CCZ in Campo Grande - MS as well as that of the Botucatu Municipal Kennel and the Botucatu Animal Protection Association (APA) for authorizing this study and for their help with the animals.

7 – References*

- Aguiar JI, Aguiar ES (1999) Serologic testing for Chagas' disease and HIV in counseling programs and blood Banks in Midwest Brasil. *Braz J Infec Dis* 3: 176-179.
- Araújo FMG, Bahia MT, Magalhães NM, Martins-Filho OA, Veloso VM, Carneiro CM et al (2002) Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Tropica* 81: 21–31.
- Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Milikan RC, Simpson L (1991) Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates, diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 48: 211-22.
- Barbosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL (1983) Tentativa de isolamento primário de *Trypanosoma cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura - agentes bloqueadores. *Rev Patol Trop* 12: 155-163.
- Borges-Pereira J, Coura JR (1986) Morbidade da doença de Chagas. Estudo seccional em uma área endêmica, Virgem da Lapa, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 139-148.
- Borges-Pereira J, Zauza PL, Galhardo MC, Nogueira JS, Pereira GRL, Cunha RV (2001) Doença de Chagas na população urbana do Distrito Sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(5): 459-466.
- Brenner Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (2000) Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2nd edn. Guanabara/Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp 21-46.
- Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR et al (1995) *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonreactive hybridization. *Exp Parasitol* 81: 462-471.
- Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC (1984) Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 26: 192-204.

* De acordo com as normas da Revista Parasitology Research

- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, et al (2008) Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Inter J Parasitol* 38: 1533–1543.
- Carriazo CS, Sembaj A, Aguerri AM, Requena JM, Alonso C, Bua J, et al (1998) Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 183-186.
- Castro CN (1980) Influência da parasitemia no quadro clínico da doença de Chagas. *Rev Pat Trop* 9: 73-136.
- Chiari E (1999) Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl 1): 299-300.
- Chioccola VLP (2009) Diagnóstico molecular das Leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no estado de São Paulo. *Bol Epidemiol Paulista* 6(68): 4-13.
- D'Alessandro A, Hincapie O (1986) *Rhodnius neivat*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg* 35: 512-514.
- Da Silva AV, Langoni H (2001) The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol* 97: 199-207.
- Dias JCP (1987) Epidemiology of Chagas` Disease in Brazil. In: Brener RR, Stoka AM, (ed) *Chagas` Disease Vectors*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1: 57-81.
- Fernandes A, Chiari E, Casanova C, Dias JC, Romanaha AJ (1992) The threat of reintroduction of natural transmission of Chagas's disease in Bambuí, Minas Gerais state, Brazil, due to *Panstrongylus megistus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87(2): 285-289.
- Fernandes AJ, Diotaiuti L, Azeredo BVM, Busek SU, Chiari E (1995) Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condições de campo. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 123.
- Godoy I (2003) Soroprevalência da infecção chagásica em moradores em municípios da Direção Regional de Saúde XI do Estado de São Paulo. Tesis, Universidade Estadual Paulista.
- Grisard EC (1999) Estudo da variabilidade do gene do mini-exon e produção de cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. Tesis, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Gurtler RE (2007) Domestic dogs and cats as source of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134: 69-82.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR (1996) Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 34: 1171-1175.
- Lauricella MA, Sinagra AJ, Paulone I, Riarte AR, Segura EI (1989) Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of Argentine Republic. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 31: 63-70.
- Lucheis SB (2005) Tripanossomatídeos em cães de pacientes chagásicos crônicos, habitantes de Botucatu (SP) e região, avaliados pelos métodos de xenodiagnóstico artificial, hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* e/ou *Trypanosoma rangeli*. Tesis, Universidade Estadual Paulista.

- Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo Jr. JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J, et al (2005) Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 11(4): 492-509.
- Luquetti AO, Rassi A (2000) Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (ed) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2nd edn. Guanabara/Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp 344-378.
- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU (1994) Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 146-148.
- Machado EMM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC (2000) A Simplified Method for Sample Collection and DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in Triatomine Vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(6): 863-866.
- Minter-Goedbloed E, Minter DM, Marshall TFC (1978) Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans Rev Soc Trop Med Hyg* 72: 217-225.
- Montenegro VM, Jiménez M, Dias JCP, Zeledón R (2002) Chagas Disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(4): 491-494.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482.
- Mott KE, França JT, Barret TV, Hoff R, Oliveira TS, Sherlock IA (1980) Cutaneous allergic reactions to *Triatoma infestans* after xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 75: 3-10.
- Pífano F, Penalver LM, Medina R, Dominguez E (1948) La infección natural del perro por el *Trypanosoma rangeli*. Primera comprobación de un reservorio vertebrado extra-humano de protozoario de la naturaleza. *Gac Med Car* 56-7.
- Pompilio MA, Dorval MEMC, Cunha RV, Britto C, Borges-Pereira J (2005) Aspectos epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença de Chagas em Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(6): 473-478.
- Portela-Lindoso AAB and Shikanay-Yasuda MA (2003) Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública* 37(1): 107-115.
- Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Lages-Silva E, et al (1998) Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 99-102.
- Ray DS (1989) Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol* 9: 1365-1367.
- Rosypal AC, Corte's-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS (2007) Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Vet Parasitol* 149: 172-177.
- Rubio M (1956) Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. *Bol Chil Parasitol* 11: 62-68.

- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Doença de Chagas, Descrição da doença (2009). http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31114. Accessed 29 october 2009.
- Silber AM, Bua J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM (1997) *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol* 85(3): 225-232.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R (1984) Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. *Rev Soc Bras Malariol Doenç Trop* 36: 305-312.
- Silveira AC, Vinhaes M (1998) Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 31(Suppl. 2): 15-60.
- Souza W (2000) O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brenner Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (ed) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2nd edn. Guanabara/Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp 88-126.
- Souza AI, Paulino-Júnior D, Sousa MG, Camacho AA (2008) Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciênc Rur* 38(5): 1351-1356.
- Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA (2009) Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 29(2): 150-152.
- Sturm N, Degraeve W, Morel C, Simpson L (1989) Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas's disease. *Mol Biochem Parasitol* 33: 205-214.
- Torres FD (2008) Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors* 1(25): 1-17.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sanches N (1998) Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* em el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Bras Biol* 48: 577-587.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM (1999) Specie specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop* 72: 203-212.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, et al (2003) Comparison of Polymerase Chain Reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68(5): 574-582.
- Wanderley DVM (1993) Controle de *Triatoma infestans* no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 17-25.

Figure 1. Dog hemoculture positive for trypanosomatid in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium. 1000x. Botucatu-SP, Brazil, 2010.



Figure 2. 1.0% agarose gel stained by Gelred™. Amplification of fragments of 330bp of *Trypanosoma cruzi* and/or *Trypanosoma rangeli* by PCR, using primers P35/P36 in five hemoculture samples for **dogs** and **cats** from Botucatu - SP. 1: Positive control (Y strain of *T. cruzi*); 2: **Dog 50**; 3: **Cat 33**; 4: **Dog 9**; 5: **Cat 50**; 6: **Dog 44**; 7: Negative control (MIX PCR); M: Standard molecular weight for DNA (100 bp – NORGEN®). Botucatu-SP, Brazil, 2010.

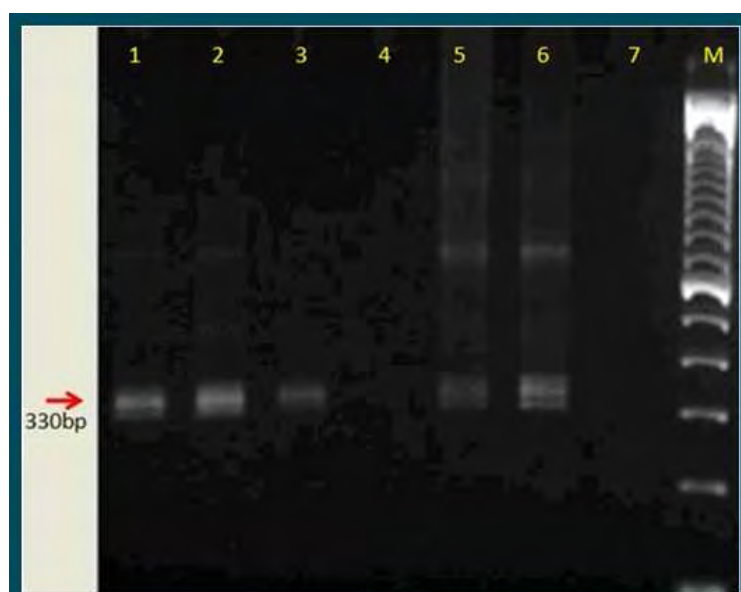


Figure 3. 1.0% agarose gel stained by Gelred™. Amplification of fragments of 188bp of *Trypanosoma cruzi* by PCR, using primers TCZ1/TCZ2 in 13 hemoculture samples for **dogs** and **cats** from Botucatu - SP. M: Standard molecular weight for DNA (100 bp – NORGEN®); 1: Positive control (Y strain of *T. cruzi*); 2: Negative control (MIX PCR); 3: **Dog 40**; 4: **Dog 41**; 5: **Dog 10**; 6: **Cat 32**; 7: **Cat 35**; 8: **Cat 44**; 9: **Cat 36**; 10: **Dog 46**; 11: **Dog 01**; 12: **Cat 39**; 13: **Cat 45**; 14: **Cat 49**; 15: **Dog 50**. Botucatu-SP, Brazil, 2010.

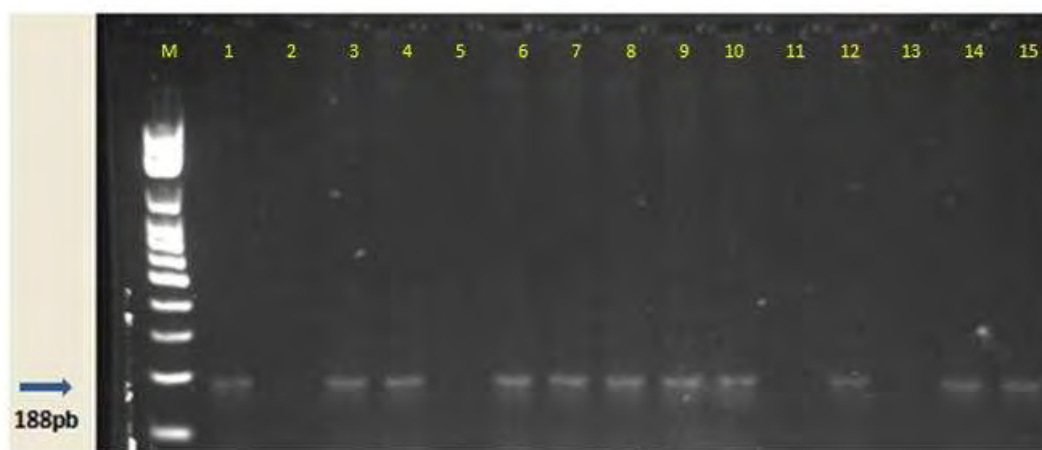


Table 1. Results of hemoculture and Polymerase Chain Reaction (PCR), using primers P35/P36 and TCZ1/TCZ2, in 100 animals (dogs and cats) from Botucatu-SP, Brazil, 2010.

PCR \ Hemoculture	Positive		Negative		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positive	1	(1)	19	(19)	20	(20)
Negative	6	(6)	74	(74)	80	(80)
Total	7	(7)	93	(93)	100	(100)