



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



PPGCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA ANIMAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

THALIANE FRANÇA COSTA

**OCORRÊNCIA DE *Trypanosoma cruzi* EM CÃES NA ÁREA ITAQUI-BACANGA,
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

SÃO LUÍS

2020

THALIANE FRANÇA COSTA

**OCORRÊNCIA DE *Trypanosoma cruzi* EM CÃES NA ÁREA ITAQUI-BACANGA,
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^a Dra. Andréa Pereira da Costa

SÃO LUÍS

2020

THALIANE FRANÇA COSTA

**OCORRÊNCIA DE *Trypanosoma cruzi* EM CÃES NA ÁREA ITAQUI-BACANGA,
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Andréa Pereira da Costa (Orientadora)
(Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA/UEMA)

Profª. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira (1º Membro)
(Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA/UEMA)

Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos (2º Membro)
(Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo fomento da pesquisa.

À Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa, por aceitar ser minha orientadora, pela parceria, por todos os ensinamentos e orientações, e também por todos os “puxões de orelha” quando foram necessários. Minha grande admiração pela pessoa, pesquisadora e professora que é.

Aos Profs. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira e Dr. Francisco Borges Costa, pelo apoio durante a execução do projeto, tanto em campo quanto em laboratório.

À minha companheira de pesquisa, Ana Vitória, também pela parceria no desenvolvimento do projeto, pela troca de conhecimentos, pelos momentos de descontração e pela paciência comigo (risos). Obrigada, Ana!

À agente comunitária de saúde do posto de saúde do Anjo da Guarda, Sra. Ana Célia, por toda disposição e esforço que teve para nos ajudar na área do estudo, facilitando a comunicação com os moradores. Sua participação foi fundamental.

A todos que auxiliaram nas coletas de campo, especialmente o colega M.V. Leandro Macedo, pela indispensável ajuda no manejo com os animais e colheitas de amostras. Muito obrigada! Além de Larissa Lima, Luis Gustavo, Davi Viegas e Thais Bastos, que também somaram esforços.

Aos demais membros e bolsistas do Laboratório de Parasitologia, que de alguma forma contribuíram.

À Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, na pessoa do Dr. Fernando Almeida Souza, por ter gentilmente cedido material para sorologia.

À toda equipe do Laboratório de Agentes Patogênicos, da UFABC/São Bernardo, pela recepção, estadia, ajuda e conhecimentos transmitidos, os quais foram essenciais. Em especial à Dra. Márcia Aparecida Sperança, Dra. Aline Diniz Cabral, doutorando Edmar Silva, mestrandas Luana Rolim e Letícia Abrantes.

Ao Sr. Raimundo, do Laboratório de Virologia, por gentilmente permitir a utilização do microscópio de fluorescência.

Aos membros dos Laboratórios de Microscopia e de Patologia Molecular, pela permissão e auxílio na utilização dos equipamentos.

“Descobri que há uma harmonia maravilhosa nas verdades complementares da fé e da ciência. O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Deus pode ser encontrado na catedral e no laboratório. Investigando a criação incrível e majestosa de Deus, a ciência pode, na verdade, ser uma forma de louvor.”

(Francis Collins)

“Apontamos o mal para dele cuidar com mais presteza e todas as energias. Trabalhamos desse modo, pelas gerações futuras.”

(Carlos Chagas)

RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose parasitária negligenciada causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que infecta uma larga variedade de mamíferos silvestres e domésticos, tendo como vetores várias espécies de triatomíneos. Estudos realizados no Brasil têm apontado o cão doméstico como animal sentinela na epidemiologia da doença, sobretudo em áreas rurais. Ainda que o Estado do Maranhão não seja considerado, atualmente, uma área endêmica para a doença de Chagas, na capital São Luís existe comprovadamente um ciclo domiciliar associado ao rato doméstico e um ciclo silvestre mantido por didelfídeos. No entanto, há poucos estudos direcionados à infecção por *T. cruzi* em cães domiciliados em ambiente urbano. Dessa forma, objetivou-se investigar a ocorrência de *T. cruzi* em cães domiciliados da área Itaqui Bacanga, São Luís, Maranhão, por meio de técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares. Foram coletadas 330 amostras sanguíneas de cães e aplicados questionários estruturados aos responsáveis, para obtenção de dados epidemiológicos e fatores de risco. A partir das amostras colhidas, foram realizadas reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico sorológico e reações em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção molecular. Foi aplicado teste exato de Fisher para cálculo estatístico das variáveis estudadas. Dos 330 animais amostrados, 20 (6,0%) animais foram reativos para ambos os testes sorológicos. Na PCR, foram detectadas 58 (17,5%) amostras positivas, e destas, 4 (0,51%) tiveram similaridade com *T. cruzi*. Estes resultados demonstram a presença de cães infectados e expostos ao *T. cruzi* na área Itaqui Bacanga, podendo ser considerados animais sentinelas para a doença de Chagas, nesse momento. O papel epidemiológico desses animais nessa região ainda deve ser elucidado por meio de estudos posteriores com os demais elementos da cadeia epidemiológica da doença.

Palavras-chaves: Doença de Chagas. Hospedeiro doméstico. Sentinela. Sorologia. PCR.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected parasitic zoonosis caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, which infects a wide variety of wild and domestic mammals, having various triatomine species as vectors. Studies conducted in Brazil have pointed the domestic dog as sentinel animal in the epidemiology of the disease, especially in rural areas. Although the state of Maranhão is not currently considered an endemic area for Chagas disease, in the capital São Luís there is a proven home cycle associated with the domestic rat and a wild cycle maintained by didelphidae. However, there are few studies directed to *T. cruzi* infection in dogs domiciled in an urban environment. Thus, the objective was to investigate the occurrence of *T. cruzi* in dogs domiciled in the Itaquí Bacanga area, São Luís, Maranhão, through parasitological, serological and molecular techniques. A total of 330 dog blood samples were collected and structured questionnaires were administered to the guardians to obtain epidemiological data and risk factors. From the collected samples, fresh blood smear slides, indirect immunofluorescence (IFAT) reactions were made for serological diagnosis and polymerase chain reactions (PCR) for molecular detection. The data from the questionnaires were tabulated in a database. Of the 330 animals sampled, 141 (42.7%) animals were reactive in the IFAT. In PCR, 55 (16.6%) positive samples were identified, and so far, no forms of *T. cruzi* were found in blood smears. These results infer dogs' contact with tripanosome. However, it is considered the possibility of co-infection and / or cross-reactions with other trypanosomatids, especially *Leishmania* spp., because the study area is endemic for leishmaniasis. However, the serological diagnosis is expected to be closed with the ELISA test and the identification of *T. cruzi* by genetic sequencing to elucidate the presence of the parasite in the region and in the sampled animals.

Key-words: Chagas disease. Domestic host. Sentinel. Serology. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da área de estudo	26.
Figura 2 – Gel de agarose a 1,5%, evidenciando as bandas na altura de 330pb, após amplificação por PCR, a partir do DNA extraído de amostras sanguíneas de cães da área Itaquí Bacanga, São Luís, Maranhão.....	34.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da reatividade sorológica, por meio da RIFI, de cães na área Itaqui Bacanga, São Luís, Maranhão, quanto às variáveis: sexo, idade, tipo de moradia, área peridomiciliar, acúmulo de matéria orgânica no domicílio e peridomicílio, convivência com outros animais, circulação e presença de animais sinantrópicos no domicílio ou peridomicílio.	32.
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE SIGLAS

DC: Doença de Chagas

DCA: Doença de Chagas Aguda

DTUs: Unidades Discretas de Tipagem

DNA: Ácido desoxirribonucléio

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: Ácido Etilenoamino Tetra Acético

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

gDNA: DNA genômico

kDNA: DNA cinetoplástico

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

pb: pares de base

PBS: Solução Salina Tampão

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm: rotações por minuto

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TBE: Tris Borato EDTA

Tc: *Trypanosoma cruzi*

USA: Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

g: giros

kb: kilobytes

mA: miliamperes

mL: mililitros

mg: miligramas

mM: milimolar

ng: nanograma

V: volts

μL: microlitro

μM: micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 GÊNERO <i>Trypanosoma</i>	17
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.2.1 Ciclo evolutivo	19
2.2.2 Hospedeiros vertebrados.....	20
2.2.3 Hospedeiros invertebrados.....	21
2.3 DOENÇA DE CHAGAS.....	22
2.3.1 Doença de Chagas no Maranhão	23
2.4 PREVALÊNCIA E INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> EM CÃES.....	23
2.4.1 Diagnóstico da infecção por <i>T. cruzi</i> em cães	Error! Bookmark not defined.
3 OBJETIVOS	Error! Bookmark not defined.
3.1 OBJETIVO GERAL	Error! Bookmark not defined.
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Error! Bookmark not defined.
4 MATERIAL E MÉTODOS	Error! Bookmark not defined.
4.1 TIPOLOGIA E LOCAL DO ESTUDO	Error! Bookmark not defined.
4.2 COLHEITA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS	Error! Bookmark not defined.
4.3 TESTES SOROLÓGICOS	Error! Bookmark not defined.
4.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	46
4.3.2 Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA).....	Error! Bookmark not defined.
4.4 TESTES MOLECULARES	Error! Bookmark not defined.
4.4.1 Extração de DNA genômico	48
4.4.2 Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs)	48
4.4.3 Eletroforese em Gel de Agarose.....	Error! Bookmark not defined.
4.4.4 Purificação e sequenciamento	Error! Bookmark not defined.

4.4.5 Alinhamento das sequências obtidas e inferências filogenéticas. Error! Bookmark not defined.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 49

5 RESULTADOS Error! Bookmark not defined.

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS CÃES E CARACTERIZAÇÃO DAS RESIDÊNCIAS
..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS **Error! Bookmark not defined.**

5.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE ACORDO COM A RIFI..... **Error! Bookmark not defined.**

5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR **Error! Bookmark not defined.**

6 DISCUSSÃO Error! Bookmark not defined.

7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS Error! Bookmark not defined.

REFERÊNCIAS..... **26**

APÊNDICES **72**

APÊNDICE 1 73

APÊNDICE 2 74

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 Introdução

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países. Estas enfermidades afetam mais de um bilhão de pessoas e oneram em bilhões de dólares as economias em desenvolvimento todos os anos. As populações que vivem em situação de pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com agentes infecciosos e animais domésticos são as mais afetadas (WHO, 2019). Nesse contexto, encontra-se a tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas (DC), zoonose parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (REY, 2017).

T. cruzi parasita uma larga variedade de mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem, além de ser uma espécie genotipicamente heterogênea, dividida em linhagens que ocorrem em diferentes biomas e hospedeiros (ZINGALES et al., 2012). Há três ciclos epidemiológicos que garantem a circulação do parasita nos diferentes ecossistemas: (i) ciclo silvestre, onde a transmissão ocorre entre triatomíneos e mamíferos silvestres no seu hábitat natural; (ii) ciclo doméstico, em que os animais domésticos e o próprio homem constituem as fontes de infecção, atuando como reservatórios (MACEDO et al., 2004); e (iii) ciclo peridoméstico, que envolve mamíferos domésticos e triatomíneos silvestres atraídos às habitações pela luz e alimentos disponíveis (FERNANDES et al., 1994; SCHOFIELD et al., 1999). No entanto, segundo Dias et. al. (2008), o ciclo doméstico apresenta-se como de maior importância epidemiológica na transmissão do parasita por permitir a manutenção da infecção chagásica em humanos.

Ainda que o estado do Maranhão não seja considerado, atualmente, uma área endêmica para a DC, na capital São Luís existe comprovadamente um ciclo domiciliar associado ao rato doméstico e o triatomíneo da espécie *Triatoma rubrofasciata*, e um ciclo silvestre mantido por didelídeos (VALENTE, 2011). Em animais, há poucos estudos que relatam a circulação ativa do parasita no estado, como Costa et al. (2015), que encontraram *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei* em mamíferos da ordem Didelphimorphia e Chiroptera. Em triatomíneos, Costa et al. (2003) e

Gurgel-Gonçalves et al. (2012) mostraram que estes desempenham um papel importante na manutenção da circulação enzoótica de *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no estado.

Os cães domésticos destacam-se como hospedeiros importantes de *T. cruzi* e estão diretamente relacionados com a maioria dos casos de infecção humana (GÜRTLER; CARDINAL 2015; MENDES et al., 2013; UMEZAWA et al., 2009). Além disso, têm sido apontados como hospedeiros que fazem ligação entre os ciclos de transmissão doméstico e silvestre de *T. cruzi* e são úteis como animais sentinelas em áreas endêmicas (ROQUE; JANSEN, 2008; RAMÍREZ et al., 2013; XAVIER et al., 2014). Dessa forma, o conhecimento da ocorrência de infecção por *T. cruzi* nesses animais pode auxiliar no direcionamento de ações de educação e vigilância ainda antes do aparecimento de casos humanos (ROQUE; JANSEN, 2014).

Como supracitado, há poucos estudos direcionados à investigação da ocorrência de infecção por *T. cruzi*, em cães de área urbana, a exemplo da área Itaqui Bacanga, situada na cidade de São Luís, Maranhão. Esta área apresenta condições que favorecem a manutenção de ciclos de transmissão de *T. cruzi* como áreas de mata, com palmeiras e açazeiros, acúmulo de lixo e matéria orgânica, degradação ambiental, residências de baixo padrão e de construção inacabada. Moradores da região relatam a presença de triatomíneos, além da presença de animais sinantrópicos.

Recentemente, um indivíduo morador de um bairro localizado nessa área, foi diagnosticado por meio de teste parasitológico com presença do parasito, possivelmente estando na fase crônica. Esse indivíduo reside em um local próximo a áreas recém-desmatadas e também próximo a áreas com vegetação. Além disso, moradores da região relatam ver os insetos vetores da doença no interior das habitações, além da presença de animais domésticos e animais sinantrópicos, como os roedores, que são potenciais reservatórios do parasito. Estas informações demonstram situação favorável à manutenção da transmissão de *T. cruzi*, incitando a necessidade de conhecimento de prevalência e incidência mais precisas e atuais da doença.

Diante do exposto, considerando a importância epidemiológica do cão em ambiente doméstico, é necessário o monitoramento desses animais a fim de identificar precocemente o surgimento da infecção pelo *T. cruzi*, ainda que seja nessa área não endêmica. Dessa forma, a pesquisa que originou esta dissertação teve como objetivo geral investigar a infecção natural por *T. cruzi* em cães domiciliados da área Itaqui-Bacanga, São Luís, Maranhão, e como objetivos específicos (i) pesquisar anticorpos anti-*T. cruzi*, por meio de testes sorológicos; (ii) verificar os fatores de risco relacionados à infecção por *T. cruzi*, em cães domiciliados da área

Itaqui Bacanga; (iii) detectar material genético e identificar *T. cruzi*, por meio de ferramentas moleculares.

2 Revisão de Literatura

2.1 Gênero *Trypanosoma*

Os parasitas do gênero *Trypanosoma* são encontrados nos hospedeiros vertebrados sob a forma tripomastigota e amastigota. Devido à sua grande variabilidade, têm sido agrupados pelas características de seus hospedeiros vertebrados: tripanossomas de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Em relação aos tripanossomas de mamíferos, diferentes subgêneros foram criados e incluídos em duas seções: Salivaria e Stercoraria (HOARE, 1972; MOLINARO et al., 2012). Hoare (1972), classificou os tripanossomas de acordo com critérios que envolvem a combinação de fatores como: número de hospedeiros vertebrados e invertebrados envolvidos no ciclo, origem geográfica, aspectos morfológicos, ciclo biológico, patogenia, características bioquímicas e fisiológicas.

Os tripanossomas agrupados na Seção Salivaria são de origem africana, possuem a característica de se desenvolverem na porção anterior do hospedeiro invertebrado e são transmitidos por inoculação, através da picada de moscas do gênero *Glossina* (transmissão inoculativa). Nesta Seção estão incluídos quatro subgêneros: *Dutonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas* (HOARE, 1972; MOLINARO et al., 2012). Somente no gênero *Trypanozoon* são encontradas espécies que completam seu desenvolvimento nas glândulas salivares. Todas as demais espécies da seção se desenvolvem exclusivamente ou na probóscide, como é o caso de *Trypanosoma vivax*, ou na probóscide e intestino da mosca (*Trypanosoma congolense*). Porém, há duas espécies que são transmitidas apenas de forma mecânica: *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma equiperdum* (HAMILTON et al., 2007; HOARE, 1972; SIMPSON et al., 2006; STEVENS et al., 2001).

Na Seção Stercoraria estão reunidos os tripanossomas que se desenvolvem na porção posterior do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, onde as formas infectantes que são eliminadas pelas fezes, penetram em solução de continuidade e mucosas do hospedeiro vertebrado, infectando-o (transmissão contaminativa). Nessa seção, foram incluídos três subgêneros: *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*. A maioria das espécies destes subgêneros não infecta o homem, e não são patogênicas para seus hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972), exceto *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) e raros casos de infecção humana por

Trypanosoma lewisi (*Herpetosoma*) (SARAPHATAN et al., 2007; VERMA et al., 2011; BHARODIYA et al., 2018).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Protozoário hemoflagelado, digenético e pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, Seção Stercoraria, Subgênero *Schizotrypanum* (HOARE, 1972; VOTYPKA et al., 2015), *T. cruzi* (CHAGAS, 1909) é o agente etiológico da doença de Chagas. Esta espécie está amplamente distribuída na natureza, porém, só é encontrada no continente americano, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos a até o sul da Argentina e Chile (LLEWELLYN, et al., 2009).

T. cruzi parasita cerca de 150 espécies de mamíferos e é capaz de colonizar quase todos os tecidos de seus hospedeiros (JANSEN et al., 2010). Além de sua multiplicidade de hospedeiros, é uma espécie genotipicamente heterogênea, com diferentes linhagens genéticas, tendo sua classificação recorrentemente modificada. Atualmente, está dividida em sete unidades discretas de tipagem (DTUs), de TcI a TcVI, e TcBat (ZINGALES et al., 2012; LIMA et al., 2014; MARCILI et al., 2009). Estas subpopulações estão relacionadas aos níveis de parasitemia, tropismo celular, patogenicidade, interação com células e resposta imune do hospedeiro (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012; LIMA et al., 2015).

Todas as DTUs são capazes de manifestar clinicamente a DC, porém as unidades TcII e TcV são aparentemente consideradas as mais patogênicas, promovendo sintomatologia cardíaca e digestiva (ZINGALES et al., 2011). O genótipo TcI é comumente representado pela cepa G, possuindo alta infectividade em análises *in vitro*, não induzindo infecção patente em experimentação *in vivo*. Os genótipos TcII e TcVI, exemplificados respectivamente pelas cepas Y e CL Brener, possuem maior infectividade *in vivo* (ZINGALES et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2015).

De acordo com as observações de Carlos Chagas, em seus primeiros estudos com o parasita, fixado e corado pelo corante de Giemsa, *T. cruzi* possui as seguintes estruturas na sua morfologia geral: núcleo, cinetoplasto (localizado próximo ao flagelo) e um flagelo livre. O protozoário possui três formas evolutivas (HOARE; WALLACE, 1966; BRENER, 1973; BOURGUIGNON et al., 2006), identificadas morfologicamente por microscopia óptica, pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e pelo surgimento de flagelo: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (BRENER, 1997; HOARE, 1972), estas últimas com duas nomenclaturas, tripomastigotas sanguíneas e tripomastigotas metacíclicas.

As formas amastigotas têm formato arredondado ou ovoide, não apresentam flagelo livre e não possuem membrana ondulante. As epimastigotas têm formato fusiforme, com flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida (MOLINARO et al., 2015; MARTINS et al., 2012). As formas tripomastigotas metacíclicas apresentam um núcleo grande e central e um cinetoplasto posicionado na região posterior terminal. O flagelo é mais curto, emergindo do corpúsculo basal próximo ao cinetoplasto, e a membrana ondulante é geralmente estreita. Nas tripomastigotas sanguíneas, o flagelo é longo (representando em média um terço do comprimento do protozoário), emerge do corpúsculo basal próximo ao cinetoplasto e a membrana ondulante é estreita (REY, 2008; SIQUEIRA-BATISTA, 2007; ALVARENGA; BRONFEN, 1997).

O cinetoplasto é uma estrutura exclusiva dos protozoários da ordem Kinetoplastida e contém altas concentrações do DNA cinetoplástico ou kDNA. Diferente das outras ordens de eucariotos, que apresentam cerca de 1% do DNA celular nas mitocôndrias, *T. cruzi* pode concentrar entre 16 a 30% do material genético total no cinetoplasto (DIAS; MACEDO, 2005). Nos tripanosomatídeos, esse kDNA é composto de aproximadamente 50 cópias de maxicírculos e de 5.000 a 20.000 minicírculos por rede, e estes representam 95% das moléculas que compõem o DNA cinetoplástico, equivalente a 10.000 a 30.000 unidades, de acordo com as espécies e linhagens de tripanossomatídeos (JUNQUEIRA; DEGRAVE; BRANDÃO, 2005; MARTINS et al., 2012).

2.2.1 Ciclo evolutivo

A transmissão de *T. cruzi* estabeleceu-se primariamente em ambiente silvestre, infectando naturalmente os hospedeiros mamíferos, sobretudo marsupiais, roedores e primatas, e tendo como vetores os triatomíneos silvestres. Porém, este ciclo foi se remodelando a partir da ocupação de áreas florestais pelo ser humano e animais domésticos, bem como da domiciliação dos insetos hematófagos, modificando a cadeia epidemiológica do *T. cruzi* (ZINGALES, 2011; TARTAROTTI et. al., 2004).

O ciclo evolutivo de *T. cruzi* é heteróximo, que envolve hospedeiros vertebrados, incluindo mais de 180 espécies de mamíferos, e invertebrados, os triatomíneos. O parasita possui quatro estágios de desenvolvimento, sendo dois replicativos: epimastigota e amastigota no inseto e vertebrado, respectivamente; e dois infectivos não replicativos: tripomastigota metacíclica e tripomastigota sanguínea no inseto e vertebrado, respectivamente (DVORAK; HYDE, 1973; HYDE; DVORAK, 1973).

Os triatomíneos não infectados realizam o repasto sanguíneo sob os hospedeiros mamíferos infectados com as formas tripomastigotas sanguíneas do parasita. No trato digestivo dos triatomíneos, ocorre a diferenciação das tripomastigotas em epimastigotas e, posteriormente, em tripomastigotas metacíclicas na porção final do intestino, sendo eliminadas nas fezes e urina do inseto (ROQUE; JANSEN, 2014). Todo o processo desde a ingestão das tripomastigotas sanguíneas pelos triatomíneos até a liberação das tripomastigotas metacíclicas nas fezes pode levar de 20 a 45 dias. No entanto, considera-se que há várias cepas que podem apresentar diferenças nos padrões de crescimento e diferenciação celular, dependendo da espécie de triatomíneo envolvida na infecção (MOLINARO et al., 2012).

Nos hospedeiros vertebrados, as tripomastigotas metacíclicas são depositadas na pele dos hospedeiros mamíferos, durante a defecação do inseto ao realizar repasto sanguíneo. Por meio da solução de continuidade originada da picada, essas formas atravessam as barreiras do sistema imune inato, penetram principalmente nas células do sistema mononuclear fagocitário, nas quais diferenciam-se em amastigotas, que por sua vez, diferenciam-se em formas tripomastigotas. Estas últimas rompem as células hospedeiras e alcançam a corrente sanguínea, condição em que são chamadas de tripomastigotas sanguíneas, com a possibilidade de penetrar em novas células ou serem ingeridas pelos triatomíneos ao realizarem um novo repasto (MARTINS et al., 2012; TYLER; ENGMAN, 2001).

2.2.2 Hospedeiros vertebrados

Os hospedeiros vertebrados de *T. cruzi* são mamíferos de diversas ordens: Didelphimorphia, Xenarthra, Chiroptera, Rodentia, Lagomorpha, Artiodactyla, Carnivora e Primates (REY, 2008). Estes hospedeiros apresentam diferenças na sua importância como fonte de infecção para o triatomíneo vetor e uma mesma espécie de mamífero pode desempenhar distintos papéis na manutenção do parasita em diferentes localidades (ROQUE; JANSEN, 2014).

Em ambiente silvestre, foram descritas espécies entre marsupiais, xenartros, morcegos, carnívoros, lagomorfos, roedores e primatas não humanos. No Brasil, atenção especial é conferida aos quirópteros e os marsupiais, pois são os mamíferos que têm apresentado a maior diversidade de genótipos e taxas de infecção de *T. cruzi*, além de outras espécies do gênero *Trypanosoma* spp. (JANSEN et al., 2018).

Os morcegos são comumente encontrados infectados por *T. cruzi*, dentre outros tripanosomatídeos (PINTO et al., 1986; LISBOA et al., 2008; ARGIBAY et al., 2016; HODO et al., 2016; COSTA et al. 2018, DARIO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018), ainda que

tenha sido demonstrado que esses animais são considerados resistentes aos diferentes genótipos de *T. cruzi* (JANSEN et al., 2018). Estes mamíferos voadores são considerados importantes reservatórios do parasita, dadas abundância e alta dispersão em determinadas áreas, e fácil adaptação ao domicílio humano (ROQUE; JANSEN, 2014). As espécies dos gêneros *Artibeus*, *Carollia* e *Phyllostomus* (Phyllostomidae) têm as maiores taxas de infecção com espécies de *Trypanosoma*, incluindo *T. cruzi* (JANSEN et al., 2018). Apesar de ter sido demonstrada recentemente a presença do parasita na glândula salivar de uma espécie de morcego hematófago, no Peru, não há evidências que possam ser transmissores diretos de *T. cruzi* a outros hospedeiros vertebrados (VILLENNA et al., 2018).

Os marsupiais do gênero *Didelphis*, em destaque as espécies *D. marsupialis* (gambá-comum) e *D. albiventris* (gambá-de-orelha-branca), representam os mamíferos silvestres com a maior frequência de infecção natural por *T. cruzi*, em diferentes biomas que se encontram (JANSEN et al., 2018). Particularmente, esses animais mantêm dois ciclos de multiplicação do *T. cruzi*: o parasita se multiplica tanto na forma epimastigota na luz das glândulas perianais, como na forma amastigota intracelular em diversos tecidos. Dessa forma, os didelfídeos podem atuar como reservatório e vetor do *T. cruzi* ao mesmo tempo (DEANE et al. 1964; ROQUE; JANSEN, 2014).

Dentre os mamíferos, os roedores são os principais alvos de predação, o que possibilita a transmissão oral do parasita. Sua importância epidemiológica fica evidente se considerarmos que muitas espécies, embora silvestres, frequentemente se aproximam e podem colonizar o ambiente peridomiciliar. A maioria dos relatos de infecção por *T. cruzi* em roedores ocorrem em *Rattus rattus* (rato doméstico), espécie sinantrópica abundante na maioria das cidades brasileiras (ROQUE; JANSEN, 2014). Roedores cavimorfos, *Thrichomys* sp., já foram encontrados infectados, todos com sorologia positiva, em uma área de surto de doença de Chagas Aguda por via oral no Ceará (ROQUE; JANSEN, 2008; COSTA et al., 2018). Entre os animais domésticos, destacam-se os cães e os gatos, além de porcos, caprinos e equinos que também podem ser infectados pelo *T. cruzi* (DEANE, 1964; NOIREAU et al., 2009; JIMÉNEZ-COELLO et al., 2012; ENRIQUEZ et al., 2014; COMEAUX et al., 2016; VIETTRI et al., 2018).

2.2.3 Hospedeiros invertebrados

Os hospedeiros invertebrados de *T. cruzi* são os insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera : Reduviidae), chamados de triatomíneos. A subfamília Triatominae divide-se em cinco tribos, incluindo 18 gêneros e 148 espécies. A maioria destas ocorre apenas

na região neotropical e algumas poucas podem ser encontradas nos Estados Unidos, centro-sul da África, sudeste da Ásia e norte da Austrália (JUBERG et al., 2014).

Panstrongylus sp., *Triatoma* sp., e *Rhodnius* são os gêneros de triatomíneos que mais se destacam como vetores de *T. cruzi* no Brasil (BRASIL, 2017a; GALVÃO, 2014). Dentre as 68 espécies de ocorrência no território brasileiro, 13 são de importância epidemiológica: *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *P. megistus*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. infestans*, *T. rubrovaria*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *T. vitticeps* (BRASIL, 2019). Na Região Nordeste, três espécies são as mais importantes para a saúde pública: *Panstrongylus megistus* (GALVÃO, 2009, 2014; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012; LIMA et al., 2012; FIDALDO et al., 2018), *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* (BRASIL, 2017a; COSTA et al., 2018; FIDALGO et al., 2018; DAFLON-TEIXEIRA et al., 2019).

2.3 Doença de Chagas

A doença de Chagas estabeleceu-se como uma zoonose há cerca de 200 a 300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, que promoveu a adaptação de insetos silvestres ao ambiente doméstico, na procura de nova fonte alimentar (ZINGALES et al., 2012). São estimados 6 a 7 milhões de pessoas infectadas, sendo a maioria na América Latina e, no mundo, são 100 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas (WHO, 2018; MASSAD, 2008). A doença continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 óbitos por ano (WHO, 2018).

A distribuição espacial da doença é limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor, daí ser também denominada “tripanossomíase americana”. Entretanto, são registrados casos em países não endêmicos por outros mecanismos de transmissão, devido à transmissão não vetorial incluindo transfusão sanguínea, transplante de órgãos e infecção congênita (SCHMUNIS, 2007; GASCON; BERN; PINAZOA, 2010; KLEIN; HURWITZ; DURVASULA, 2012).

A transmissão da DC pode ocorrer de diferentes formas (COURA, 2015; BRASIL, 2017b; PINHEIRO et al., 2017): (i) contato com fezes/e ou urina de triatomíneos infectados; (ii) ingestão de alimentos contaminados com parasitas provenientes de triatomíneos infectados; (iii) via materno-fetal; (iv) transfusão de sangue ou transplante de órgãos; (v) acidentes laboratoriais, pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado; (vi) transmissão sexual. Considerando o potencial das mucosas para a transmissão, inclui-se

também a via sexual como teoricamente possível, tendo sido demonstrada a transmissão em modelos animais e possibilidade de transmissão em população humana (ARAÚJO et al., 2017; RIOS et al., 2018).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos decorrentes de infecções por via vetorial ocorridas nas décadas que antecederam o controle do *Triatoma infestans* (cerca de 2 milhões de casos). Entretanto, nos últimos anos, a ocorrência de casos e surtos de doença de Chagas aguda (DCA) vem sendo observada em diversos estados brasileiros, especialmente na região Amazônica, geralmente estão associados à transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados com fezes de triatomíneos (FUJITA; NASCIMENTO; ANDRADE-JÚNIOR, 2019; FIGUEIRA et al., 2019).

2.3.1 Doença de Chagas no Maranhão

Até a década de 70, não havia sido notificado nenhum caso da doença de Chagas no estado do Maranhão, entretanto, a partir de um inquérito sorológico nacional, aplicado entre 1975 e 1980, como parte do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH), do Ministério da Saúde, foi constatada uma prevalência de infecção de 0,1% (CAMARGO et al., 1984). Os primeiros casos autóctones foram descritos, em 1975, detectados em três indivíduos provenientes da Ilha de São Luís e um da Baixada Maranhense (SILVA et al., 1985).

A transmissão do parasito no estado é predominantemente vetorial, no ambiente silvestre e peridomiciliar (CUTRIM et al., 2010). Dados de comparação de notificação da doença no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e na Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), entre os anos de 2007 e 2011, constatarem problemas em relação à vigilância epidemiológica da doença (RODRIGUES et al., 2013). Informações contidas no SINAN, em relação à DCA, demonstram que do ano de 2007 ao ano de 2018, sessenta e um casos foram notificados e confirmados nos seguintes municípios: Barra do Corda (3), Bequimão (1), Caxias (2), Coelho Neto (1), Icatu (1), Imperatriz (1), Pedro do Rosário (20), Pinheiro (4), Porto Franco (1), Rosário (1), São Luís (2), Santa Rita (1), São Roberto (5), São Vicente Ferrer (1), Turiaçu (4), Turilândia (11), Tutóia (1) e Zé Doca (1) (BRASIL, 2019).

2.4 *T. cruzi* em cães: prevalências de infecção, doença e diagnóstico

Os cães e gatos são os animais domésticos que representam alguns dos primeiros hospedeiros de *T. cruzi* estudados por Carlos Chagas. Estudos demonstram a possibilidade desses animais atuarem como importantes reservatórios do parasita, mas, assim como acontece

com as demais ordens de mamíferos, sua importância no ciclo de transmissão varia de uma região para outra (ROQUE; JANSEN, 2014). Os cães domésticos têm sido comumente apontados com fonte alimentar para vetores de triatomíneos. Na região do Chaco Argentino, cães e gatos são importantes na epidemiologia de *T. cruzi* e são altamente infectantes para os vetores (GÜTLER et al., 2015).

De maneira geral, a infecção por *T. cruzi* em cães está distribuída no continente americano, tendo sido relatada com mais frequência em países da América Central e na América do Sul (ENRIQUEZ et al. 2013, 2019; CHIKWETO et al., 2014; SALDAÑA et al., 2015; ZAMORA-LEDESMA et al., 2016; ORTIZ et al., 2016; CURTIS-ROBLES et al., 2017, 2018; GALAVIZ-SILVA et al., 2017; ARCE-FONSECA et al., 2017; MEJÍA et al., 2018; TAHIR et al., 2018; PORFIRIO et al., 2018; ELMAYAN et al., 2019; BONILLA et al., 2019). Em relação às DTUs, todas já foram identificadas em cães (ROELLIG et al., 2008; CARDINAL, et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2013). No Brasil, há ocorrências de infecção canina por *T. cruzi* em todas as regiões geográficas, em pelo menos um estado, em ambiente rural, urbano, domiciliar e peridomiciliar (XAVIER et al., 2012; LEÇA-JUNIOR et al., 2013; MENDES et al., 2013; MORAIS et al., 2013; FERNANDES et al., 2016; PEREZ et al., 2016; BRASIL et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

A espécie canina é a única capaz de desenvolver alterações patológicas crônicas semelhantes às detectadas em humanos, o que permite que sobrevivam vários anos albergando o protozoário (BARR et al., 1995; GÜRTLER et al., 2007; SANTANA et al., 2012). Normalmente os cães se infectam por via oral devido ao hábito de lamber a lesão, ou pela ingestão dos insetos vetores (GÜRTLER et al., 2009).

Nesses animais, a doença se manifesta primariamente com uma cardiomiopatia que se desenvolve em decorrência do dano causado pelo parasita às células do miocárdio ou reações imunomediadas. A fase aguda caracteriza-se por miocardite ou encefalite em cães jovens, e a fase crônica, por cardiomiopatia dilatada em cães senis (TILLEY; SMITH, 2003; NELSON; COUTO, 2006). As manifestações clínicas mais graves, em fase aguda, podem estar associadas à via de infecção, considerando a carga parasitária presente, como é o caso da via oral, semelhante ao que ocorre em humanos (QUIJANO-HERNÁNDEZ et al., 2012; ARAÚJO, et al., 2013). Na fase crônica, o animal apresenta fraqueza, intolerância a exercícios, síncope e morte súbita (TILLEY; SMITH, 2003; NELSON; COUTO, 2006).

O diagnóstico baseia-se no exame clínico e laboratorial, com a pesquisa do parasita no sangue, além de diagnóstico sorológico e molecular. Tanto na fase aguda quanto na crônica, deve-se realizar investigação epidemiológica (USSUI; SILVA, 2008). Os testes mais utilizados

no Brasil para o diagnóstico de DC em cães, são os testes sorológicos, frequentemente RIFI e ELISA. A problemática desses testes é a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, sobretudo com espécies de *Leishmania* spp. (considerando a endemicidade de leishmanioses no país), ou mesmo com outros tripanossomas (MATOS et al., 2015; CABALERRO et al., 2007).

Ainda que a importância dos cães na epidemiologia da transmissão do *T. cruzi* já tenha sido evidenciada em diferentes regiões do continente americano, não há testes sorológicos comerciais para o diagnóstico da infecção chagásica nesses animais. No entanto, recentemente, foi desenvolvido um ensaio sorológico imunoenzimático utilizando matrizes antigênicas quiméricas. Nesta metodologia, a detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* em soros de cães infectados mostrou-se uma ferramenta promissora para diagnóstico veterinário e estudos epidemiológicos (LEONY et al., 2019).

Algumas estratégias de detecção do kDNA de *T. cruzi* por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido empregadas. Dentre elas, a utilização dos primers 121 e 122, os quais amplificam um fragmento de 330pb dos minicírculos que compõem o kDNA (BRITTO et al., 1995; WINCKER, et al., 1994). Os autores consideraram que, ao utilizar esses iniciadores, houve maior sensibilidade da PCR quando comparada aos testes parasitológicos convencionais (WINCKER et al., 1994; BRITTO et al., 1995; GOMES et al. 1999). A alta sensibilidade do kDNA para detectar infecções por *T. cruzi* em cães naturalmente infectados apoia sua aplicação como uma ferramenta de diagnóstico complementar à sorologia e pode substituir o uso de xenodiagnóstico ou hemocultura (ENRIQUEZ et al., 2013).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Viviam Tavares *et al.* Dogs infection by *Trypanosoma cruzi* in São Domingos do Capim, State of Pará, Brazil. **Braz. J. Vet. Med**, Rio de Janeiro, v. 37, n. Supl.1, p. 106-112, Dec. 2015.

ALMEIDA, Arleana do Bom Parto Ferreira de *et al.* Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in Central Western Brazil: a case report. **Rev. Inst. Med. Trop. de S. Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 287-289, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652013000400011>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652013000400287&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 set. 2019.

ALVARENGA, Nelson J.; BRONFEN, Elisabeth. Metaciclologênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 30, n. 3, p. 247-250, June 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821997000300012>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000300012&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 23 set. 2019.

ARAÚJO, Perla F. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 6, p. 437-446, June 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160538>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000600437&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 23 set. 2019.

ARAÚJO, Isabela M. *et al.* Infecção por *Trypanosoma cruzi* em um cão domiciliado da área urbana do município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 4. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n4p56>. Disponível em: <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/740/609>. Acesso em: 19 set. 2019.

ARAÚJO NETO, Vicente Toscano, CAMARA, A. C. *Trypanosoma cruzi* circulating among dogs and triatomines in the endemic countryside of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Acta Trop.** June 2019, v. 27, 105067. DOI 10.1016/j.actatropica.2019.105067. [Epub ahead of print]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31255585>. Acesso em: 14 set. 2019.

ARCE-FONSECA, Minerva. *et al.* Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 120. Sep. 2017. DOI 10.1186/s40249-017-0333-z. Disponível em: <https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-017-0333-z>. Acesso em: 14 set. 2019.

ARGIBAY, Hernán D. *et al.* First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. **Parasitology**. Cambridge, v. 143, n.11, p. 1358-1368, Sep. 2016. DOI 10.1017/S0031182016000925. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/first-finding-of-trypanosoma-cruzi-ii-in-vampire-bats-from-a-district-free-of-domestic-vector-borne-transmission-in-northeastern-argentina/6832C4DE7CBD33173B5A61E2CE5E456E>. Acesso em: 14 set. 2019.

ARGOLO, A. M., Felix, M., Pacheco, R., Costa, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz: Fundação Carlos

Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2008. 67p. DOI 0.13140/2.1.1578.9449. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/wp-content/uploads/2017/08/09-Doen%C3%A7a-de-Chagas-e-seus-principais-vetores-no-Brasil.pdf>. Acesso em: 14 set. 2019.

BARR, Stephen C., *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in Walker hounds from Virginia. **Am J Vet Res.**, Schaumburg, v.56, n.8, p.1037-1044, Ago. 1995.

BHARODIYA, Dilip., *et al.* Trypanosomiasis in a Young Infant from Rural Gujarat, India. **Indian Pediatr**, v. 55, n. 1, p. 69-70. Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13312-018-1233-4>. Disponível em: <https://www.indianpediatrics.net/jan2018/69.pdf>. Acesso em: 14 set. 2019.

BONILLA, Marta C., *et al.* Canine trypanosomiasis in an endemic Costa Rican community: Demonstration of the active infection cycle. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports**, v. 17, Aug. 2019, 100307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100307>.

BOURGUIGNON, Saulo C., *et al.* Biological aspects of the *Trypanosoma cruzi* (Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote, obtained in modified liver infusion tryptose (LIT) medium. **Acta Trop.** v. 98, n. 1, p. 103-109. Apr 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.02.006>.

BRASIL, Arthur Willian de Lima., *et al.* Prevalence and risk factors associated with *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infections in dogs presented at veterinary clinics in João Pessoa, Paraíba state, northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 2293-2300, set./out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/16790359.2018v39n5p2293>. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/32025/24272>. Acesso em: 19 set. 2019.

BRASIL. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Doença de Chagas Aguda**. Tabulação de dados - DATASUS. 2018. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Acesso em: 22 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. Volume Único [recurso eletrônico]. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 705p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico**. v. 50, n. 2, Jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informações Técnicas sobre Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 04 abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 04 abr. 2018.

BRENER, Zigman. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Rev Microbiol.** v. 27. N.1 p. 347-382. Oct. 1973. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/action/showCitFormats?doi=10.1146%2Fannurev.mi.27.100173.002023>. Acesso em: 10 set. 2019.

BRENER, Zigman. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Dias JCP, Coura JR (editores). In: **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. 486 p. ISBN 85-85676-31-0. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/nf9bn/pdf/dias-9788575412435-03.pdf>.

BRITTO, Constança., *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, Cambridge, v. 110, n. 3, p. 241-247, Apr. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182000080823>.

CABALLERO, Zuleima, C. *et al.* Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp.. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n.8, p. 1045-9. Aug 2007. DOI 10.1128/CVI.00127-07. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2044488/>.

CAMARGO, Mário E., REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 18, n. 4, p. 500-519. Jul. 1969. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.500>.

CAMARGO, Mário E. *et al.* Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 192-204, Aug. 1984. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651984000400003>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651984000400003&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 23 set. 2019.

CARDINAL, Marta Victoria, *et al.* High levels of human infection with *Trypanosoma cruzi* associated with the domestic density of infected vectors and hosts in a rural area of northeastern Argentina. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 492, Aug 2018. DOI 10.1186/s13071-018-3069-0. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3069-0>. Acesso em: 18 set. 2019.

CARDINAL, Maria Victoria, *et al.* Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Int. J. Parasitol**, v. 38, n. 13, p. 1533-43, Nov. 2008. DOI 10.1016/j.ijpara.2008.04.010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3143243/>. Acesso em: 30 ago. 2019.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, Aug. 1909. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007402761909000200008&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 23 set. 2019.

CHIKWETO, A. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in stray and pet dogs in Grenada, West Indies. **Trop Biomed**, v. 31, n. 2, p. 347-50, June 2014.

COMEAX, Juliette M., *et al.* Survey of Feral Swine (*Sus scrofa*) Infection with the Agent of Chagas Disease (*Trypanosoma cruzi*) in Texas, 2013–14. **J Wildl Dis.**, v. 52, n. 3, p. 627-630, Jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.7589/2015-08-208>.

COSTA, Andréa Pereira da *et al.* *Trypanosoma cruzi* in Triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões, Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 51, n. 4, p. 445-451, Aug. 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822018000400445&lng=en&nrm=iso. Acesso em 24 de setembro de 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0098-2018>.

COSTA, Andréa Pereira da, *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from Maranhão State, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.15, n.11, p. 656–666, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1771>.

COSTA, Jane *et al.* The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 443-449, June 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000400002>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000400002&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 23 set. 2019.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar; JUNQUEIRA, Angela C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 856-862, Nov. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140236>.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277-282, May 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140362>.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 645, p. 6-7, 2010.

CURTIS-ROBLES, Rachel *et al.* Parasitic interactions among *Trypanosoma cruzi*, triatomine vectors, domestic animals, and wildlife in Big Bend National Park along the Texas-Mexico border. **Acta Trop.**, v. 188, p. 225-233. Dec. 2018. DOI 10.1016/j.actatropica.2018.09.002.

CURTIS-ROBLES, Rachel *et al.* Epidemiology and Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in Naturally-Infected Hound Dogs and Associated Triatomine Vectors in Texas, USA. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 1, Jan. 2017. DOI 10.1371/journal.pntd.0005298.

CUTRIM, Flávia Stella Rego Furtado *et al.* Doença de Chagas no Estado do Maranhão, Brasil: registro de casos agudos no período de 1994 a 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 705-708, Dec. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000600021>.

DAFLON-TEIXEIRA, Natalia Faria *et al.* Multiple Approaches to Address Potential Risk Factors of Chagas Disease Transmission in Northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** V. 100, n. 2, p. 296 – 302, Feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0480>. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.18-0480>. Acesso em 24 de setembro de 2019.

DARIO, Maria Augusta *et al.* High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo State, Brazil. **PLoS One**, v. 12, e0188412, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188412>.

DEANE, L. M. Animal Reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Rev Bras Malariol Doencas Trop.**, v. 16, p. 27-48, 1964.

DEGRAVE, Wim *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Bioch Parasit**, v. 27, p. 63-70, 1988.

DIAS, João Carlos Pinto; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, José Rodrigues (editor). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

DIAS, João Carlos Pinto. Human Chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. **J Trop Med**, v. 2013, ID: 789758, 9p, March, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/789758>.

DIAS, João Carlos Pinto; PRATA, Aluizio; COURA, José Rodrigues. Emmanuel Dias: o principal artífice do combate à doença de Chagas nas Américas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, n. 5, p. 502-504, Oct. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500013>.

DOS SANTOS, Francisco C. B *et al.* *Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera: Mammalia) from Acre State, Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 6, May 2018, p. 828-837. DOI 10.1017/S0031182017001834.

DVORAK, James A.; HYDE, Thomas P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 268-283, Oct. 1973. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(73\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(73)90087-8).

ELMAYAN, Ardem *et al.* High prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in shelter dogs from southern Louisiana, USA. **Paras Vectors**, v. 12, article 322. June 2019, DOI 10.1186/s13071-019-3572-y.

ENRIQUEZ, G. F. *et al.* High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. **Infect. Genet. Evol.**, v. 25, p. 36-43, July 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.002>

ENRIQUEZ, G. F., *et al.* Polyparasitism and zoonotic parasites in dogs from a rural area of the Argentine Chaco. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports**, v. 16, n. 100287, April 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100287>.

ENRIQUEZ, G. F. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. **Acta Trop**, v. 126, n. 3, p. 211-217, Mar 2013. DOI 10.1016/j.actatropica.2013.03.001.

FERNANDES, Alexandre José *et al.* Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 473-480, Dec. 1994. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1994000400007>.

FERNANDES, Annielle Regina da Fonseca *et al.* Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 90-98, Mar. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016010>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000100090&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 set. 2019.

FREITAS, Yannara Barbosa Nogueira *et al.* Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do Norte, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 51, n. 2, p. 190-197, Apr. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2017>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822018000200190&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 set. 2019.

GALAVIZ-SILVA, Lucio *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. **Rev Argent Microbiol**, v. 49, n. 3, p. 216-223. Jul-Sep 2017. DOI 10.1016/j.ram.2016.11.006.

GALVÃO, Cleber. (org). **Vetores da doença de chagas no Brasil [online]**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Disponível em: SciELO Books <http://books.scielo.org>.

GALVÃO, Camila Regalado. **Estudo dos fatores associados à infecção chagásica em área endêmica do Rio Grande do Norte**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GASCON, Joaquim; BERN, Caryn; PINAZOA, María-Jesús. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, p. 22-27, 2010.

GOMES, Monica L. *et al.* Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 2, p. 205-210, Feb 1999. DOI 10.4269/ajtmh.1999.60.205.

GURGEL-GONÇALVES, Rodrigo *et al.* Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*

in the Brazilian savanna. **Acta Trop**, v. 121, n. 2, p. 105-111, Feb. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.010>.

GURGEL-GONÇALVES, Rodrigo *et al.* Geografic Distribution of Chagas Disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-15, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/705326>.

GÜRTLER, Ricardo E.; CARDINAL, M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v. 151, p. 32–50. Nov. 2015. DOI 10.1016/j.actatropica.2015.05.029. Epub 2015 Jun 5.

GÜRTLER, Ricardo E. *et al.* Effects of topical application of fipronil spot-on on dogs against the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.103, n.1, p. 298–304, Mar 2009. DOI 10.1016/j.trstmh.2008.09.018.

GÜRTLER, Ricardo E. *et al.* Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, v. 134 (Pt 1), p. 69–82. Jan 2007. DOI 10.1017/S0031182006001259 Epub 2006 Oct 11.

HAMILTON, Patrick B.; GIBSON, Wendy C.; STEVENS, Jaime R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol Phylogenet Evol**, v. 44, n. 1, p. 15-25, Jul 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.023>. Epub 2007 Apr 13.

HOARE, Cecil A.; WALLACE, Franklin G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385-6, 1966.

HOARE, Cecil A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**, p. 1-723. 1972.

HODO, Carolyn L. *et al.* Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. **Acta Trop**, v. 164, p. 259–266, Dec 2016. DOI 10.1016/j.actatropica.2016.09.013.

HYDE, Thomas P.; DVORAK, Jaime A. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. II. Quantitative analysis of the penetration phase. **Exp Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 284-294. Oct 1973.

JANSEN, Ana Maria. Roque André Luiz Rodrigues. Domestic and wild mammalian reservoir. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. **American trypanosomiasis Chagas Disease —100 years of research**. London: Elsevier; 2010. p. 249–76.

JANSEN, Ana Maria; XAVIER, Samanta Cristina das Chagas; ROQUE, André Luiz Rodrigues. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasite Vectors**, v. 11, n. 502, 2018. DOI 10.1186/s13071-018-3067-2.

JIMÉNEZ-COELLO, M. *et al.* Epidemiological Survey of *Trypanosoma cruzi* Infection in Domestic Owned Cats from the Tropical Southeast of Mexico. **Zoonoses Public Health**, v. 59, suppl. 2, p. 102-109, Sep. 2012. DOI 10.1111/j.1863-2378.2012.01463.x.

- JUNQUEIRA, Angela C. V.; DEGRAVE, Wim; BRANDÃO, Adeilton. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 6, p. 270-272, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.04.001>
- JURBERG, José; Rodrigues *et al.* **Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas)**. Instituto Oswaldo Cruz, 2014. 52p.
- LECA JUNIOR, Nilo Fernandes *et al.* First report of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from southern Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 182-185, Mar. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013005000003>.
- LEONY, Leonardo M. *et al.* Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, n. 6, p 1-16.. Jun 2019. DOI 10.1371/journal.pntd.0007545. e0007545.
- LIMA, Luciana *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta tropica**, v. 151, p. 166-177, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>.
- LIMA, Marli M. *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs, **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 3, Mar 2012, p. 143–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.013>.
- LLEWELLYN, Martin S. *et al.* Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 5, May 2009. e1000410. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>.
- LIMA, Valdirene dos Santos *et al.*. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. **PLoS One**, v. 9, n. 12, e116137, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116137>.
- LISBOA, Cristane Varella *et al.* *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 156, n. 3-4, p. 314-8. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.06.004.
- MACEDO, Andrea M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas Diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2004. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000100001>.
- MAGALHÃES, Luisa M. D. *et al.* Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 7, e0003816, Jul 2015.
- MARCILI, Arlei *et al.* Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infect. Genet. Evol.** v. 9, p. 1265–1274, 2009. DOI 10.1016/j.meegid.2009.07.003.

MARTINS, André Vianna *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **The Journal Infection**, v.16, n.1, p. 45-58, 2012. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70057-7).

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 136, n. 9, p. 1153-1164, Dec 2007. DOI 10.1017/S0950268807009879.

MATOS, Haroldo José de *et al.* **7 Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 6, n. 1, p. 65-68, Mar. 2015.

MEJÍA, A. *et al.* Serological evidence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs treated at veterinary clinics in the conurbation of Cuernavaca, Morelos. **Salud Publica Mex.** v. 59, n. 3, p. 205-206, 2017. DOI 10.21149/7945.

MELO, S. A. *et al.* Bovine trypanosomiasis an emerging disease in Maranhão State-Brazil. **Vector Borne Zoon. Dis.** v. 11, n. 7, p. 853-856, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0107>.

MENDES, Rodrigo S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas canina no semiárido paraibano. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1459-1465, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200011>.

MOLINARO, Etelcia M.; CAPUTO, Luzia F. G.; AMENDOEIRA, Maria R. R. (org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: v. 5. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2012.

MORAIS, Arielle N. *et al.* Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.** v. 22, n. 2, p. 225-229, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013005000024>.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Tripanossomíase Americana**. Medicina Interna de Pequenos Animais. 3º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1266-1267.

NOIREAU, F., DIOSQUE, P., JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research.** v. 40, n. 2, p.26, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres/2009009>.

ORTIZ, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* diversity in infected dogs from areas of the north coast of Chile. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.** v. 5, p. 42-47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.09.004>.

PASSOS, L. A. C. *et al.* Sobrevida e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. **Epidemiol. Serv. Saúde.** v. 21, n. 2, p. 223-232, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742012000200005>.

PEREZ, Taliha D. *et al.* Prevalence of American trypanosomiasis and leishmaniasis in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 79, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658079>.

PINHEIRO, Eloan et al. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 50, n. 3, p. 296-300, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0433-2016>.

PINTO, A. S.; DA COSTA BENTO, D. N. *Trypanosoma cruzi*-like bloodstream trypomastigotes in bats from the State of Piauí, Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 19, n. 1, p. 31-34, 1986. ISSN 0037-8682. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821986000100007>.

PORFIRIO, Grasiela E. O. et al. Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 7, n. 3 p. 398-404, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.004>.

QUIJANO-HERNÁNDEZ, Israel A. et al. Evaluation of clinical and immunopathological features of different infective doses of *Trypanosoma cruzi* in dogs during the acute phase. **The Scientific World Journal.** v. 2012, 2011.

RAMÍREZ J. D. et al. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. **Vet. Parasitol.** v. 196, p. 216-219, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.054>.

REY, Luís. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIOS, Adriano et al. Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 113 n. 1, p. 3-8, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170025>.

ROCHA, Fabiana L. et al. *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. **Parasitology**, Cambridge, v. 140 n. 2, p. 160–170, 2013. DOI: 10.1017/S0031182012001539.

RODRIGUES, J. R. A. et al. Doença de Chagas Aguda no Estado do Maranhão, Brasil: Uma comparação entre os bancos de dados do SINAN e da FUNASA. **JMPHC.** v. 4, p. 3-9, 2013. ISSN 2179-6750. DOI: <https://doi.org/10.14295/jmphc.v4i1.160>.

ROELLIG, D. M. et al. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. **Emerg. Infect. Dis.** EUA, v. 14, n. 7, p. 1123-1125, 2008. ISSN: 1080-6059. DOI 10.3201/eid1407.080175.

ROMANHA, A. J. **Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*.** Belo Horizonte: UFMG, 1982

ROQUE A. L. R.; JANSEN A. M. The importance of sentinel domestic animals to identify risk areas to the emergence of Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41, p. 191-193, 2008.

ROQUE, A. L. R., JANSEN, A. M. **Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores.** In: GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, p. 75-87, 2014.

SALDAÑA A. et al. Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 110, n. 7, p. 936-944, 2015. DOI 10.1590/0074-02760150284.

SANTANA, Vanessa L. et al. Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v.32, n. 6, p. 536-541, 2012. ISSN 0100-736X. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000600011>.

SANTOS, H. J. **Um terço de memória, entre o Anjo da Guarda e Capela de Onça, e os heróis do Boi de Ouro: a história de fato e de direito do bairro Anjo da Guarda.** São Luís: Lithograf, 2012.

SARATAPHAN, N. et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. **J. Med. Microbiol.** v. 56, n. 8, p. 1118-1121, 2007. DOI 10.1099/jmm.0.47222-0.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 102, suppl. I p. 75-85, 2007. DOI: 10.1590/s0074-02762007005000093.

SCHOFIELD, C. J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J. P. The process of domestication in triatominae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 375-378, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700073>.

SILVA, A. R. et al. Primeiros casos agudos autóctones da doença de Chagas no Maranhão e inquérito soroepidemiológico da população. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 18, n. 4, p.269-270, 1985. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821985000400013>.

SIMPSON, Alastair G. B.; STEVENS Jamie R.; LUKES, Julius. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.006>.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GELLER M.; MARTINS A. V.; BASTOS, O. M. P. *Trypanosoma cruzi*. In: SIQUEIRA-BATISTA R. et al. **Moléstia de Chagas.** 2ª edição. Rio de Janeiro: Rúbio, 2007.

SOUZA A. I. et al. Seroprevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* in dogs in a rural area of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 150-152, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000200011>.

SOUZA, Graziela B. et al. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in dogs located in Ituberá, Southern Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 881-886, 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n2p881.

STEVENS, Jamie; RAMBAUT, Andrew. Evolutionary rate differences in trypanosomes. **Infect. Genet. Evol.** v. 1, n. 2, p. 143-150, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(01\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(01)00018-1).

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: Use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol. Bio. Parasitol.** v. 33, p. 205-214, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90082-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90082-0).

TAHIR, Djamel et al. Molecular and serological investigation of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in French Guiana. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.** v. 12, p. 106-109, 2017. DOI: [10.1016/j.vprsr.2017.06.004](https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.06.004).

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON C. R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arq. Ciênc. Saúde.** São José do Rio Preto, v. 11, p. 44-47, 2004.

TELLERIA, J. et al. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Exp. Parasitol.** v. 114, n. 4, p. 279-88, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.04.005>.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana).** Consulta Veterinária em 5 Minutos – Espécies Canina e Felina. 2ª ed. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2003. p. 538.

TRINDADE, Charlene N. S. et al. Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) for *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban and rural areas of Pelotas, RS. **B. Industr. Anim.** Nova Odessa, v. 72, n. 2, p. 111-116, 2015. DOI: [10.17523/bia.v72n2p111](https://doi.org/10.17523/bia.v72n2p111).

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int. J. Parasitol.** v. 31, n. 5-6, p. 472–481, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9).

UMEZAWA, E. S. et al. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, São Paulo, v. 111, n.1, p.15–20, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.006>.

USSUI, C. A.; SILVA, R. A. Doença de Chagas. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. **Doença de Chagas.** Brasília: Ministério da Saúde, 1989.

VALENTE, Vera da C. **Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão.** Tese. Belém: UFPA - Instituto de Ciências Biológicas, 2011.

VERMA, Archana et al. *Trypanosoma lewisi* or *T. lewisi*-like infection in a 37-day-old Indian infant. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 85, n. 2, p. 221–224, 2011. DOI: [10.4269/ajtmh.2011.11-0002](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0002). Disponível em:

VIETTRI, Mercedes et al. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas.

Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports. v. 14, p. 123-130, 2018. DOI 10.1016/j.vprsr.2018.10.002.

VILLENA, Fredy E. et al. First Report of *Trypanosoma cruzi* Infection in Salivary Gland of Bats from the Peruvian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 99, n. 3, p. 723-728, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0816>.

VOTÝPKA, Jan et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends Parasitol.** v. 31, n. 10, p. 460-469, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015>.

WINCKER, Patrick et al. 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.** Baltimore, v. 51, p. 771-777, 1994. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.771>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases.** Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 30 ago. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.** WHO: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012. (WHO Technical Report Series, 975).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** 17 abr. 2019. Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 19 jun. 2019.

XAVIER S.C.C. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS Negl Trop. Dis.** v. 8, p. 2878, 2014.

XAVIER S. C. C. et al. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 6, n. 5, 1647, 2012. DOI 10.1371/journal.pntd.0001647.

ZAMORA-LEDESMA, S. et al. Presence of trypanosomatid antibodies in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Queretaro, Mexico. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.** v. 5, p. 25-30, 2016. DOI 10.1016/j.vprsr.2016.08.005.

ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia.** v. 6b, p. 44-48, 2011. ISSN 1984-5154. DOI: 10.7594/revbio.6b.09.

ZINGALES, Bianca, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 104. n. 7, p. 1051-1054, 2009. DIO: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.

ZINGALES, Bianca et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infec. Genet. Evol.** v. 12, n. 2, p. 240-

253, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134811004564?via%3Dihub>. Acesso em:

CAPÍTULO 2 – Soroprevalência e detecção de *Trypanosoma cruzi* em cães domiciliados de uma área não endêmica na Amazônia Legal

Soroprevalência e detecção de *Trypanosoma cruzi* em cães domiciliados de uma área não endêmica na Amazônia Legal

Thaliane França Costa^a, Ana Vitória Verde Oliveira Rocha^a, Leandro Macedo Miranda^a, Larissa Fernanda Soares Lima^a, Fred Luciano Neves Santos^b, Ângelo Antônio Oliveira Silva^b, Fernando Almeida de Souza^c, Aline Diniz Cabral^d, Márcia Aparecida Sperança^d, Francisco Borges Costa^a, Rita de Maria Seabra Nogueira^a, Andréa Pereira da Costa^{a*}

^a Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

^b Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil.

^c Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

^d Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

*** Corresponding author**

Dra. Andréa Pereira da Costa

Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA/UEMA

Cidade Universitária Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, nº 1000, Jardim São Cristóvão,

CEP 65055-310 – São Luís/MA

Telefone: (98) 2016-8100 FAX: (98) 3257-367

E-mail: andrea.costa@professor.uema.br

RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose parasitária negligenciada causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que infecta uma larga variedade de mamíferos silvestres e domésticos, tendo como vetores várias espécies de triatomíneos. Estudos realizados no Brasil têm apontado o cão doméstico como animal sentinela na epidemiologia da doença, sobretudo em áreas rurais. Ainda que o Estado do Maranhão não seja considerado, atualmente, uma área endêmica para a doença de Chagas, na capital São Luís existe comprovadamente um ciclo domiciliar associado ao rato doméstico e um ciclo silvestre mantido por didelfídeos. No entanto, há poucos estudos direcionados à infecção por *T. cruzi* em cães domiciliados em ambiente urbano. Dessa forma, objetivou-se investigar a ocorrência de *T. cruzi* em cães domiciliados da área Itaqui Bacanga, São Luís, Maranhão, por meio de técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares. Foram coletadas 330 amostras sanguíneas de cães e aplicados questionários estruturados aos responsáveis, para obtenção de dados epidemiológicos e fatores de risco. A partir das amostras colhidas, foram realizadas reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico sorológico e reações em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção molecular. Foi aplicado teste exato de Fisher para cálculo estatístico das variáveis estudadas. Dos 330 animais amostrados, 20 (6,0%) animais foram reativos para ambos os testes sorológicos. Na PCR, foram detectadas 58 (17,5%) amostras positivas, e destas, 4 (0,51%) tiveram similaridade com *T. cruzi*. Estes resultados demonstram a presença de cães infectados e expostos ao *T. cruzi* na área Itaqui Bacanga, podendo ser considerados animais sentinelas para a doença de Chagas, nesse momento. O papel epidemiológico desses animais nessa região ainda deve ser elucidado por meio de estudos posteriores com os demais elementos da cadeia epidemiológica da doença.

Palavras chave: doença de Chagas, hospedeiro doméstico, sentinela, sorologia, PCR.

51 ABSTRACT

52 Chagas' disease is a neglected parasitic zoonosis caused by the flagellated protozoan
53 *Trypanosoma cruzi*, which infects a wide variety of wild and domestic mammals, with vectors
54 of several species of triatomines. Studies carried out in Brazil have identified the domestic dog
55 as a sentinel animal in the epidemiology of the disease, especially in rural areas. Although the
56 State of Maranhão is not currently considered an endemic area for Chagas disease, in the capital
57 São Luís there is a proven home cycle associated with the domestic rat and a wild cycle
58 maintained by didelfids. However, there are few studies targeting *T. cruzi* infection in dogs
59 living in an urban environment. Thus, the objective was to investigate the occurrence of *T. cruzi*
60 in dogs domiciled in the Itaquí Bacanga area, São Luís, Maranhão, using parasitological,
61 serological and molecular techniques. 330 blood samples were collected from dogs and
62 structured questionnaires were applied to those responsible for obtaining epidemiological data
63 and risk factors. From the samples collected, indirect immunofluorescence reactions (RIFI) and
64 an immunosorbent assay (ELISA) were performed for serological diagnosis and polymerase
65 chain reactions (PCR) for molecular detection. Fisher's exact test was applied for the statistical
66 calculation of the studied variables. Of the 330 animals sampled, 20 (6.0%) were reactive for
67 both serological tests. In PCR, 58 (17.5%) positive samples were detected, and of these, 4
68 (0.51%) were similar to *T. cruzi*. These results demonstrate the presence of dogs infected and
69 exposed to *T. cruzi* in the Itaquí Bacanga area, which can be considered sentinel animals for
70 Chagas disease at that time. The epidemiological role of these animals in this region has yet to
71 be elucidated through further studies with the other elements of the disease's epidemiological
72 chain.

73 Keywords: Chagas disease, domestic host, sentinel, serology, PCR.

74

75

1. Introdução

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas (DC), é uma zoonose parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido por insetos reduvídeos da subfamília Triatominae (Rey, 2017). A DC encontra-se distribuída mundialmente, principalmente nos países da América Latina, constituindo um dos maiores problemas de saúde pública, por causar incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 óbitos por ano, sendo considerada uma doença tropical negligenciada, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2018).

T. cruzi parasita uma larga variedade de mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem, além de ser uma espécie genotipicamente heterogênea, dividida em linhagens que ocorrem em diferentes biomas e hospedeiros (Zingales et al., 2011). Estas linhagens correspondem às sete unidades discretas de tipagem (DTUs), as quais são TcI a TcVI, e TcBat (Zingales et al., 2012; Lima et al., 2014; Marcili et al., 2009). Dentre os ciclos epidemiológicos que garantem a circulação do parasita nos diferentes ecossistemas, o doméstico, que envolve triatomíneos no intra e peridomicílio, animais domésticos e o próprio homem, apresenta-se como de maior importância epidemiológica na transmissão do parasita por permitir a manutenção da infecção em humanos (Macedo et al., 2004; Dias et al., 2008).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções por via vetorial ocorridas nas décadas que antecederam o controle do *Triatoma infestans* (cerca de 2 milhões de casos). Entretanto, nos últimos anos, a ocorrência de casos e surtos de doença de Chagas aguda (DCA) vem sendo observada em estados brasileiros, especialmente na região Amazônica, e geralmente estão associados à transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados com fezes e/ou urina dos triatomíneos (Figueira et al., 2019).

No estado do Maranhão, nos últimos dez anos, foram notificados 61 casos de DCA, sendo em sua maioria por transmissão oral (Brasil, 2019). Há poucos estudos que relatam a circulação ativa do parasita no estado. Nesse sentido, já foram detectados mamíferos da ordem Didelphimorphia e Chiroptera infectados com *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei* (Costa et al., 2015). Costa et al. (2003) e Gurgel-Gonçalves et al. (2012) demonstraram que os triatomíneos desempenham um papel importante na manutenção da circulação enzoótica de *T. cruzi* e de *Trypanosoma rangeli* no estado. Na capital São Luís já foi comprovada a existência de um ciclo doméstico associado ao rato doméstico e ao triatomíneo da espécie *Triatoma rubrofasciata*, bem como um ciclo silvestre mantido por didelfídeos (Valente, 2011).

Em ambiente doméstico, os cães destacam-se como importantes hospedeiros de *T. cruzi* e estão diretamente relacionados com a maioria dos casos de infecção humana (Umezawa et al., 2009; Mendes et al., 2013; Gurtler; Cardinal, 2015). Além disso, já foram apontados como hospedeiros que fazem ligação entre os ciclos de transmissão doméstico e silvestre do parasita, sendo úteis como animais sentinelas em áreas endêmicas (Roque; Jansen, 2008; Ramírez et al., 2013; Xavier et al., 2014). Desta forma, o conhecimento da ocorrência de infecção canina por *T. cruzi* pode auxiliar no direcionamento de ações de educação e vigilância ainda previamente ao aparecimento de casos humanos (Roque; Jansen, 2014).

A área Itaqui Bacanga, situada na cidade de São Luís, caracteriza-se por ser uma região de pequenos e grandes bairros, sendo em sua maioria, de periferia, apresentando áreas de mata, com palmeiras e açazeiros, acúmulo de lixo e matéria orgânica, degradação ambiental, residências de baixo padrão e de construção inacabada. Estas condições constituem, dentre outras, fatores determinantes para a transmissão e manutenção de *T. cruzi*, (WHO, 2012; Dias, 2013; Coura; Vinãs; Junqueira., 2014).

Diante do exposto, é evidente a importância epidemiológica do cão em ambiente doméstico, sendo necessário o monitoramento destes animais com o objetivo de identificar

precocemente o surgimento da doença de Chagas humana. Assim, o presente estudo buscou investigar a infecção natural de cães por *T. cruzi* em na área Itaqui Bacanga, São Luís, Maranhão.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos legais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (protocolo 09/2018) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, Brasil, seguindo os Princípios Éticos em Experimentação Animal e submetido à Plataforma Brasil.

2.2 Local do estudo

A pesquisa foi realizada entre os meses de novembro de 2018 e abril de 2019, em três bairros localizados na área Itaqui-Bacanga (Figura 1), a saber: Anjo da Guarda, Vila São Luís e Fumacê. Estes bairros situam-se Oeste de São Luís, entre o Rio Bacanga (a Leste), o Oceano Atlântico (ao Norte) e a Baía de São Marcos (ao Oeste). Ao Sul, limita-se com povoados e distritos da Zona Rural de São Luís (Santos, 2012).

2.3 Tipologia do estudo e amostragem

O universo amostral foi composto por cães domiciliados, machos e fêmeas, com idade acima de 6 meses, exceto fêmeas com gestação avançada e animais errantes. Cada cão foi considerado um evento independente, mesmo quando morava na mesma casa.

A definição do tamanho da amostra foi feita com base na amostragem aleatória simples de uma população finita e com prevalência prévia (Thursfield, 2004). Para este estudo foi considerada uma prevalência de 50%, dada a ausência de dados de prevalência da DC na população canina da área de estudo (Thursfield, 2004). O cálculo da amostragem foi realizado

usando um intervalo de confiança de 95% e margem de erro aceitável de 5%. A população canina foi estimada em 2.035, o que representa uma população de cães 1/10 habitantes, considerando que a população humana da área amostrada é cerca de 20.355 indivíduos, de acordo com dados da Secretaria Municipal de Saúde. Dessa forma, após o ajuste do tamanho da amostragem, o número ideal de caninos obtido foi de 323, sendo arredondado para 330 animais.

2.3 Coleta de amostras sanguíneas

As coletas eram realizadas de casa em casa, com abordagem e explanação do objetivo da pesquisa ao responsável pelo(s) animal(is). Após a autorização por meio da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os cães foram submetidos à contenção física, seguida de antissepsia local com álcool a 70%. Em seguida, foram coletados 5 mL de sangue, em média, por punção das veias cefálica, jugular ou safena. Visando obter dados referentes a aspectos epidemiológicos, concomitante à coleta do sangue, foi aplicado aos responsáveis pelos animais um questionário estruturado com questões abertas e fechadas.

As amostras foram armazenadas em tubos sem anticoagulantes e, paralelamente, em microtubos tipo *eppendorf* contendo etanol absoluto (98%), devidamente identificados, transportados até o laboratório, sob refrigeração a 4°C, em caixa isotérmica. Para obtenção do soro, as amostras em tubos sem anticoagulantes foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos, e posteriormente armazenadas em microtubos estéreis tipo *eppendorf*, os quais foram armazenados -20 °C, até a realização dos testes sorológicos. As amostras em etanol absoluto foram estocadas a -20 °C até a realização da análise molecular.

4.4 Análises laboratoriais

4.4.1 Diagnóstico sorológico de *Trypanosoma cruzi*

As reações de imunofluorescência indireta (RIFIs) foram realizadas conforme a técnica descrita por Camargo & Rebonato et al. (1969). O antígeno foi preparado com formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas F90 e Y88), cedido pelo Instituto Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. O ponto de corte da reação foi de 1:40, sendo realizadas titulações seriadas na razão de 2. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência na objetiva de 40x de aumento, após preparação de cada lâmina com glicerina tamponada e lamínula. A positividade da reação implicou na observação da fluorescência verde dos parasitas, comparada às amostras de controle positivo e negativo.

Os testes de ELISA foram realizados utilizando quatro antígenos recombinantes quiméricos do *T. cruzi* para a detecção de anticorpos IgG específicos: IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4. Tratam-se de moléculas multi-epítipo formadas por regiões conservadas e repetitivas do parasita unidas por espaçadores que permitem que a estrutura proteica seja linearizada. Esta etapa do estudo foi realizada em colaboração com a equipe do Dr. Fred Santos, do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), no Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz/Bahia). Os genes sintéticos responsáveis pela expressão das moléculas IBMP foram subclonados no vetor pET28a e expressos em *Escherichia coli* BL21-Star (ThermoFisher Scientific). A expressão foi induzida com 0,5 μ M de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e as proteínas solúveis purificadas por cromatografia de troca iônica e de afinidade. Em seguida, os antígenos foram quantificados por fluorometria (Qubit, ThermoFisher Scientific). Detalhes sobre a obtenção e sequência das moléculas podem ser obtidas em Santos et al., 2016. A sensibilização das microplacas, bem como as etapas de realização dos imunoenaios no formato ELISA indireto foram realizados segundo a técnica descrita por Leony et al. (2019). Cada amostra recebeu um código identificador no laboratório para garantir uma análise cega. A análise de classe latente (LCA) foi adotada para definição do perfil sorológico das amostras submetidas aos testes de ELISA, conforme descrito por Santos

et al. (2018). De acordo com este tipo de análise, uma amostra é definida como positiva caso tenha resultado positivo (índice de reatividade $\geq 1,0$) em duas ou mais moléculas. Por outro lado, amostras com resultado positivo somente em uma das moléculas ou negativo em todas elas foram consideradas negativas (Santos et al., 2018).

4.4.2 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico (gDNA), foram retiradas aproximadamente 20mg de sangue armazenado nos microtubos com etanol absoluto, transferindo-se para um novo microtubo estéril. Neste, foi realizada lavagem com 500 μ L de PBS pH 7,2, e após centrifugação a 12.000xg durante 10 minutos à temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante. Em seguida, foi realizada a extração de gDNA utilizando o kit PureLink™ Genomic DNA Minikit (Invitrogen®, Carlsbad, USA), de acordo com o protocolo recomendado pela fabricante. Após a extração, procedeu-se à eletroforese em gel de agarose a 1% a fim de verificar a qualidade do ácido nucléico.

4.4.3 Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs)

Fragmentos de DNA foram amplificados por PCR, utilizando o par de iniciadores Tc121 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'; onde K = T ou G) e Tc122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), os quais permitem amplificar fragmentos de 330pb de kDNA de *T. cruzi* (Sturm et al., 1989; Telleria et al., 2006). A escolha deste alvo foi proposital, uma vez que esta região se encontra repetida quatro vezes por molécula circular e estas estão presentes em cerca de 10.000 cópias por célula (Degraive et al., 1988; Sturm et al., 1989). Estas sequências de nucleotídeos apresentam a característica de se ligarem em um trecho das quatro regiões constantes dos minicírculos de *T. cruzi* e promoverem amplificação em direção à região variável (Sturm et al., 1989). Os produtos da PCR foram homogeneizados com

225 2µL de *loading buffer* e em seguida foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de
226 agarose a 1,5% corado com Safe Blue (Invitrogen®).

228 4.4.3 Purificação e sequenciamento

229 Os amplicons foram purificados em colunas GFX™ dos kits de DNA PCR e Gel Band
230 Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e submetidos à reações de
231 sequenciamento de Sanger, com o kit terminador ABI PRISM® BigDye v. 3.1™ (Perkin-
232 Elmer® - Applied Biosystems®, Foster, CA, EUA), de acordo com as especificações do
233 fabricante, e sequenciado em sequenciador automático ABI PRISM®-310 Genetic Analyzer
234 (Perkin-Elmer® - Applied Biosystems®, Foster, CA, EUA). As sequências obtidas foram
235 comparadas com sequências depositadas no GenBank para verificar similaridade com *T. cruzi*.

237 4.5 Análise estatística

238 Os resultados foram analisados através de tabelas de contingências com as diferentes
239 variáveis. A comparação dos dados foi feita pelo teste exato de Fisher. As diferenças foram
240 consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Para os testes estatísticos foi utilizado o
241 programa computacional EpiInfo versão 6 de 1993 e versão 3.4.3 de 2007.

243 5. Resultados

244 5.1 Caracterização dos animais e residências amostrados

245 Dos 330 cães, 165 (50,0%) eram fêmeas e 165 (50,0%) eram machos, 76 (23,0%) tinham
246 de 6 meses a 1 ano de idade e 254 (77,0%) tinham idade acima de 1 ano. Quanto à livre
247 circulação, 127 cães (38,4%) tinham acesso à rua e 203 (61,5%) não tinham. 66,4% (n=219)
248 dos cães conviviam com outros animais, sendo os gatos e as aves (principalmente galinhas) os
249 mais comuns.

Em relação às condições das residências dos animais, 301 (91,2%) eram de alvenaria com reboco e 29 (8,7%) eram de alvenaria sem reboco. Em 253 (76,6%) tinham acúmulo de matéria orgânica como plantas e lixo no domicílio, 277 (83,9%) no peridomicílio, 223 (67,5%) em ambos os ambientes e 54 (16,3%) só no peridomicílio. Em 182 (55,1%) tinham somente residências ao redor, em 143 (43,3%) havia área de mata e em 5 (1,5%) havia terreno baldio. Animais sinantrópicos no domicílio ou peridomicílio, principalmente os ratos e marsupiais, foram relatados em 270 (81,8%) casas.

5.2 Diagnóstico sorológico

A RIFI detectou 105 cães reativos para IgG anti-*T. cruzi*, demonstrando um percentual de soropositividade de 42,7%. As amostras positivas apresentaram os seguintes títulos de anticorpos: 1:40 (32/105); 1:80 (31/105); 1:160 (21/105); 1:320 (5/105); 1:640 (8/105); 1:1280 (4/105); 1:2560 (2/105) e 1:5120 (2/105).

Considerando os resultados obtidos nos testes de ELISA e na análise de classe latente, foi verificada soropositividade para 46 amostras (13,9%). Deste quantitativo, 24 (54,1%) amostras foram positivas em duas moléculas, 7 (15,2%) em três moléculas e 15 (32,6%) mostraram-se reativas para todas elas. Em relação às amostras negativas, foi observado que 236 amostras não reagiram para todas as moléculas analisadas, enquanto que 48 amostras foram reativas somente para uma das quatro moléculas quiméricas. Uma vez que estes antígenos já foram validados usando a análise de classe latente (Santos et al., 2018), nosso grupo resolveu optar pelo uso da LCA como padrão-ouro a ser adotado em nosso estudo. Desta forma, a RIFI apresentou sensibilidade de 43,5% (IC95% 30,2-57,8%), especificidade de 70,1% (IC95% 64,5-75,1%) e acurácia de 66,4% (IC95% 61,1-71,2%).

Combinando os resultados de sorologia, 20 (6,0%) amostras foram positivas em ambos os testes (Tabela 1).

5.3 Diagnóstico molecular

Por meio da Reação em Cadeira de Polimerase, foi observada amplificação de fragmentos de 330pb de kDNA de *T. cruzi* em 58 (17,5%) amostras. Após sequenciamento, três (6,8%) amostras mostraram similaridade com *T. cruzi*.

5.4 Análise estatística

A análise univariada não revelou diferenças significativas para as variáveis estudadas.

6. Discussão

A infecção natural por *T. cruzi* em cães encontra-se amplamente distribuída pelo continente americano (Enriquez et al., 2013, 2019; Chikweto et al., 2014; Saldaña et al., 2015; Zamora-Ledesma et al., 2016; Ortiz et al., 2016; Curtis-Robles et al., 2017, 2018;; Galaviz-Silva et al., 2017; Arce-Fonseca et al., 2017; Mejía et al., 2018; Tahir et al., 2018; Porfirio et al., 2018; Elmayan et al., 2019; Bonilla et al., 2019). No Brasil, há relatos de infecção canina em pelo menos um estado de cada região geográfica, em diferentes ambientes e ecótopos, com taxas de prevalências variadas (Xavier et al., 2012; Leça-Junior et al., 2013; Mendes et al., 2013; Morais et al., 2013; Fernandes et al., 2016; Perez et al., 2016; Brasil et al., 2018; Souza et al., 2018).

Ensaio sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* geralmente são utilizados em pesquisas de triagem. Em nosso estudo, por meio do diagnóstico sorológico para *T. cruzi*, obteve-se soroprevalência de 6,0% (20/330) em cães domiciliados na cidade de São Luís, Maranhão. Em dois estados vizinhos, também da região Nordeste, já foram encontradas prevalências próximas: no Piauí, 7,7% em cães de área periurbana (Perez et al., 2016) e no Tocantins (Morais et al., 2013), 4,5% em cães de área rural. De semelhante modo, na Paraíba,

Mendes et al. (2013) e Fernandes et al. (2016), encontraram prevalências 4,0% e 7,9% dos cães avaliados por sorologia, respectivamente.

Por outro lado, na mesma região geográfica, há dados de soroprevalências acima de 10%. No estado do Rio Grande do Norte, endêmico para doença de Chagas, Freitas et al. (2018) e Araújo-Neto et al. (2019) avaliaram, por meio de sorologia, cães que viviam em ambiente rural de localidades distintas, e obtiveram 11% e 40% de positividade, respectivamente. No estado do Ceará, 22% dos cães de municípios periurbanos eram soropositivos para *T. cruzi* (Lima et al., 2012). No estudo realizado por Roque et al. (2013), em uma área de alto risco de transmissão para a doença de Chagas no Pará, encontrou-se prevalência de 30,8%.

Em áreas endêmicas para doença de Chagas, é natural que haja cães que atuem como reservatórios domésticos infectados com *T. cruzi*. Contudo, já foram encontrados cães com sorologia (3,9%) e PCR (0,6%) positivos na Guiana Francesa, país de baixo risco de surgimento da doença (Tahir et al., 2018), assim como a área do presente estudo.

A área Itaqui Bacanga é uma microrregião da cidade de São Luís que apresenta características urbanas e rurais, porém, os cães amostrados no presente estudo são oriundos de bairros urbanizados. Cães que habitam ambientes rurais tendem a ter contato mais próximo com triatomíneos e/ou animais silvestres naturalmente infectados, aumentando a probabilidade de adquirir a infecção. No entanto, é interessante observar que em um estudo realizado por Lucheis et al. (2005), os cães da zona urbana apresentaram maiores taxas de infecção por *Trypanosoma* spp. do que cães da zona rural, resultados esses determinados pela hemocultura e PCR. Nesse mesmo trabalho, não foram encontrados espécimes de triatomíneos em nenhum dos ecótopos.

T. cruzi é um parasita de múltiplos hospedeiros que estabelece padrões de interação peculiares e dinâmicos com cada uma de suas centenas de espécies hospedeiras, as quais desempenham papéis diferentes na rede de transmissão de parasitas dos diferentes habitats e biomas em que ocorre (Jansen et al., 2018). Considerando a característica da área onde os

animais foram amostrados nos trabalhos supracitados, nota-se que tanto em ambientes urbanos e rurais, há indícios de circulação de *T. cruzi*.

Em nosso estudo, a análise estatística não apontou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os animais positivos e as variáveis avaliadas como fatores de risco (Tabela 1), assim como fora encontrado por Almeida et al. (2013) no Pará e Freitas et al. (2013) no Rio Grande do Norte. No entanto, o contato com outros animais já foi associado à soropositividade para *T. cruzi* em cães amostrados em inquéritos sorológicos realizados no Brasil (Mendes et al., 2013; Fernandes et al., 2016).

Embora nenhuma das variáveis tenham sido identificadas como fatores de risco para a ocorrência de *T. cruzi* neste estudo, em 43,3% das casas onde os cães viviam, o peridomicílio era composto de área de mata, com árvores frutíferas e acúmulo de matéria orgânica, com presença de ratos domésticos e morcegos, além de contato com outros animais, incluindo aves. Esse cenário torna-se apto ao estabelecimento de um ciclo peridoméstico de *T. cruzi*, com envolvimento de pequenos mamíferos sinantrópicos, animais domésticos e vetores triatomíneos. Diante disso, é necessário averiguar a ocorrência do parasita nesses indivíduos, para melhor entendimento da epidemiologia do parasita nessa região.

Os resultados do diagnóstico sorológico permitem inferir que os cães foram expostos ao *T. cruzi*. Como a região do presente estudo não é endêmica para doença de Chagas, esses animais podem ser considerados hospedeiros sentinelas, pois mostraram infecção sorologicamente detectável e podem indicar que está ocorrendo transmissão do *T. cruzi* no local (Brasil, 2009; Xavier et al., 2012).

Devido à capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA específico, a PCR é uma técnica altamente sensível para detecção de DNA de *T. cruzi* em cães naturalmente infectados e, dessa forma, aplica-se como uma ferramenta de diagnóstico complementar à sorologia (Gomes et al., 1999; Enriquez et al., 2013). No diagnóstico molecular por PCR, 16,6% (55/330)

foram positivas e dentre estas, três tiveram similaridade com *T. cruzi*. Em algumas (X) amostras, por meio da eletroforese, foi observado mais de uma banda de amplicon acima de 330pb, e em alguns (X) dos produtos sequenciados, houve similaridade apenas com parte das sequências de oligonucleotídeos do kDNA do parasita. Isto sugere a detecção de DNA de outros tripanosomas que infectam cães no Brasil, como *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma caninum* e *Trypanosoma rangeli* (Stevens et al., 1989; Franke et al., 1994; Colpo et al., 2005; Francisco et al., 2007; Porfírio et al., 2018; Figueras et al., 2019; Bilheiro et al., 2019 Pinto et al., 2010; Madeira et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Lucheis et al., 2005).

A amplificação da região variável do minicírculo de kDNA, com o uso dos iniciadores Tc 121 e Tc122, produz bandas na altura de 330pb e permite a detecção do equivalente a um milésimo de uma única célula do parasita (Sturm et al., 1989; Ávila et al., 1991). Porém, em relação ao *T. rangeli*, Sturm et al. (1989) afirma que este triapanosoma pode ser amplificado com os mesmos pares de iniciadores utilizados para o kDNA do *T. cruzi*, resultando em um produto de 760 pb e bandas adicionais que variam de 300 a 450 pb. Isto ocorre devido à igualdade na sequência de bases nitrogenadas de sítios específicos de anelamento dos iniciadores, comuns ao *T. cruzi* e *T. rangeli*, dificultando assim a análise de infecções únicas e mistas (Sturm et al., 1989).

Assim como neste estudo, baixos números de detecção molecular de *T. cruzi* em cães foram obtidas por outros autores na região Nordeste. Leça-Júnior et al. (2013), detectaram 2 (n=272) cães domiciliados de zona rural da Bahia. Neste mesmo estado, de 392 cães de área urbana, em dois foi observada detecção de DNA de *T. cruzi*. Por outro lado, percentuais muito superiores foram registrados por Porfírio et al. (2015) (50%; 31/62) em cães amostrados oriundos de assentamentos rurais no Mato Grosso do Sul, e por Araújo-Neto et al. (2019) (42,5%; 17/40) em cães de municípios rurais no Rio Grande do Norte.

Neste estudo, todas as amostras positivas no diagnóstico molecular foram negativas no diagnóstico sorológico. Isto pode ser explicado a partir do entendimento a do curso da doença nesses animais. Em cães, a parasitemia ocorre dentro de duas a quatro semanas após a primeira infecção, com anticorpos anti-*T. cruzi* detectáveis em 15 dias a 4 semanas pós-infecção, como demonstrado em estudos experimentais (Andrade et al., 1997; Barr et al., 1991; Veloso et al., 2008; Machado et al., 2001; Barr et al., 2005; Barbabosa-Pliego et al., 2009).

A ausência de anticorpos indicadores de fase crônica aliado à presença de material genético de *T. cruzi* encontrada em três amostras deste estudo, reflete infecções agudas e evidencia a presença do parasita em sangue periférico, e dessa forma, podem atuar como fonte de infecção para os vetores nesse momento. Embora os animais silvestres, como gambás e várias espécies de roedores, constituam o elo entre o ambiente peridomiciliar e domiciliar, os cães são apontados como principal fonte para triatomíneos domiciliados (Roque et al. 2013, Gurtler; Cardinal 2015).

Os cães podem infectar-se pela ingestão de triatomíneos infectados, pelo contato com fezes dos vetores com tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* ou, eventualmente, por infecção congênita (Estrada-Franco et al., 2006; Travi et al., 2018). No que refere à proximidade de cães com triatomíneos, na Ilha de São Luís, dez espécies já foram encontradas associadas às habitações das áreas urbanas e periurbanas: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lignarius*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* e *Triatoma rubrofasciata* (Rêbello et al., 1998).

Estudo realizado por Brazil et al. (1985) detectou infecção natural por *T. cruzi* em 19,7% dos triatomíneos examinados, sobretudo em bairros da região do Bacanga e Centro da capital. Àquela época, os pesquisadores sinalizaram a presença de triatomíneos silvestres, como *R. pictipes* com alto índice de infecção natural e apontaram para a probabilidade de domiciliação desses insetos ao longo do tempo (Brazil et al., 1985). Dessa forma, é possível que os cães

amostrados na região estão ou estiveram em proximidade com os vetores, apesar da ausência de registros atuais de triatomíneos infectados na área Itaqui Bacanga (ou em São Luís).

Os cães cumprem os atributos desejáveis como sentinelas naturais e, às vezes são um ponto de entrada de cepas silvestres de parasitas, a exemplo de *T. cruzi*, pois geralmente não são monitorados, nem o seu contato com ambiente rural é restringido, e além disso, mantém contato íntimo com humanos (Gürtler; Cardinal, 2015). No México, Estrada-Franco et al. (2006) demonstraram que cães infectados aumentam o risco de transmissão dentro de habitações humanas, havendo correlação direta de soropositividade entre humanos e cães, onde há vetores domiciliados. Na Venezuela, as maiores taxas de soropositividade para cães (84%) foram relacionadas a domicílios habitados por pessoas soropositivas (20%) e infestação frequente de triatomíneos em ambiente fechado (70%) (Crisante et al., 2006). Por outro lado, estudos no sudoeste dos Estados Unidos demonstraram que a infecção por *T. cruzi* em cães é altamente prevalente em regiões onde a infecção humana é praticamente inexistente (Kjos et al. 2008, Curtis-Robles et al. 2017), sinalizando a possibilidade desses animais estarem atuando como barreiras para a infecção humana.

Este é um estudo pioneiro que investigou a presença de cães infectados com *T. cruzi* na cidade de São Luís, Maranhão e confirmou que há ocorrência de *T. cruzi* em cães nessa área não endêmica. Os dados aqui obtidos prenunciam que novos estudos sejam conduzidos, no sentido de averiguar a ocorrência do parasita nos elementos que constituem a cadeia epidemiológica da doença de Chagas. Além disso, a evidência de cães infectados numa área onde nunca foi registrada doença de Chagas canina sinaliza/recomenda aos clínicos veterinários que realizem o diagnóstico diferencial quando do aparecimento de cães com sintomatologia clínica compatível, a fim de fornecer cuidados veterinários adequados e dessa forma, em conjunto com outras ações, melhorar vigilância e diagnóstico da doença de Chagas.

Tabela

Tabela 1. Análise univariada (teste exato de Fisher) para a associação entre variáveis independentes e os resultados sorológicos para diagnóstico da presença de *Trypanosoma cruzi* em cães domésticos na cidade de São Luís, Maranhão.

Variável	Categoria	Positivo/exposto	%	Negativo/exposto	%	Valor de p
Sexo	Macho	14/165	8,48	151/165	91,52	0,104
	Fêmea	6/165	3,63	159/165	96,37	
Acesso à rua	Sim	7/127	5,51	120/127	94,49	0,816
	Não	13/203	6,40	190/203	93,60	
Tipo de Moradia	Alvenaria	19/301	6,31	282/301	93,69	1,000
	Outro	1/29	3,44	28/29	96,56	
Convivência com outros animais	Sim	14/219	6,39	205/219	93,61	0,811
	Não	6/111	5,40	105/111	94,60	
Matéria orgânica no peridomicílio	Presença	18/307	5,86	289/307	94,14	0,639
	Ausência	2/23	8,69	21/23	91,31	
Área de mata ao redor	Sim	10/143	6,99	133/143	93,01	0,643
	Não	10/187	5,34	177/187	94,66	
Presença de animais sinantrópicos	Sim	19/270	7,03	251/270	92,97	0,142
	Não	1/60	1,60	59/60	98,40	

Referências

Almeida, VT, Kobayashi, YT, da S, Roque, ALR, Barros, JHS, de Castro, LRS, Madeira, EAO, Uzcategu, RAR, Fernandes, JI, 2015. Dogs infection by *Trypanosoma cruzi* in São Domingos do Capim, State of Pará, Brazil. Braz. J. Vet. Med. 37, 106-112.

Almeida, ABP, Paula, DAJ, Otton, MLP, Jaune, FW, Cruz, RAS, Madeira, MF, Nakazato, L, Mendonça, AJ, Pescador, CA, Sousa, VRF, 2013. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in Central Western Brazil: a case report. Rev. Inst. Med. Trop. 55, 287-289.

Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Hilbert SL, et al. (1997). The indeterminate phase of Chagas' disease: Ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. Am J Trop Med Hyg 57: 328–336.

ARAÚJO, Isabela M. *et al.* Infecção por *Trypanosoma cruzi* em um cão domiciliado da área urbana do município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil. Ars Veterinária, v. 29, n. 4. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n4p56>. Disponível em: <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/740/609>. Acesso em: 19 set. 2019.

ARAÚJO NETO, Vicente Toscano, CAMARA, A. C. *Trypanosoma cruzi* circulating among dogs and triatomines in the endemic countryside of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Acta Trop. June 2019, v. 27, 105067. DOI 10.1016/j.actatropica.2019.105067. [Epub ahead of print]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31255585>. Acesso em: 14 set. 2019.

ARCE-FONSECA, Minerva. *et al.* Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. Infect Dis Poverty, v. 6, n. 120. Sep. 2017. DOI 10.1186/s40249-017-0333-z. Disponível em: <https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-017-0333-z>. Acesso em: 14 set. 2019.

Barbabosa-Pliego A, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck SM, et al. (2009) *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacan) are pathogenic: a dog model. *Am J Trop Med Hyg* 81: 390–395.

Barr S, Warner K, Kornreic B, Piscitelli J, Wolfe A, et al. (2005) A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 5160–5162. 10.1128/AAC.49.12.5160-5161.2005

BONILLA, Marta C., *et al.* Canine trypanosomiasis in an endemic Costa Rican community: Demonstration of the active infection cycle. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*, v. 17, Aug. 2019, 100307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100307>.

BRASIL, Arthur Willian de Lima., *et al.* Prevalence and risk factors associated with *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infections in dogs presented at veterinary clinics in João Pessoa, Paraíba state, northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 39, n. 5, p. 2293-2300, set./out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/16790359.2018v39n5p2293>. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/32025/24272>. Acesso em: 19 set. 2019.

BRASIL, 2019. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Doença de Chagas Aguda. Tabulação de dados - DATASUS. 2019. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Acesso em: 22 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. Boletim Epidemiológico. v. 50, n. 2, Jan. 2019.

Brazil RP, Silva AR, Albarelli A, Vale FJ. Distribuição e infecção de triatomíneos por *Trypanosoma* do tipo *cruzi* na Ilha de São Luís-Maranhão. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 18: 257-260, Out-Dez, 1985

CAMARGO, Mário E., REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. Am J Trop Med Hyg, v. 18, n. 4, p. 500-519. Jul. 1969.DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.500>.

CHIKWETO, A. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in stray and pet dogs in Grenada, West Indies. Trop Biomed, v. 31, n. 2, p. 347-50, June 2014.

CONCEIÇÃO, Valdirene Pereira da; CARVALHO, Roberto; BOUÇAS, David. Roteiros turísticos para os Participantes da 64ª Reunião Anual da SBPC. São Luís: EDUFMA, 2012. 28 p.

Costa, AP, Costa, FB, Soares, HS, Ramirez, DG, Mesquita, ET, Gennari, SM, Marcili, A, 2015. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from Maranhão State, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 15, 656–666.

Costa, J, Almeida, CE, Dotson, Ellen, M, Lins, A, Vinhaes, Márcio, Silveira, AC, Beard, CB, 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 98, 443-449.

Jane *et al.* The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 443-449, June 2003. DOI: [http://dx.doi.org/10.1590/S0074-](http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000400002)

02762003000400002. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000400002&lng=en&nrm=iso)

02762003000400002&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 23 set. 2019.

Coura, JR, Viñas, PA, Junqueira, Angela CV, 2014. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 109, 856-862.

Crisante G., Rojas A., Teixeira M.M.G. & Añez N. 2006. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. Acta Trop. 98:247-254.

CURTIS-ROBLES, Rachel *et al.* Parasitic interactions among *Trypanosoma cruzi*, triatomine vectors, domestic animals, and wildlife in Big Bend National Park along the Texas-Mexico border. Acta Trop., v. 188, p. 225-233. Dec. 2018. DOI 10.1016/j.actatropica.2018.09.002.

CURTIS-ROBLES, Rachel *et al.* Epidemiology and Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in Naturally-Infected Hound Dogs and Associated Triatomine Vectors in Texas, USA. PLoS Negl Trop Dis., v. 11, n. 1, Jan. 2017. DOI 10.1371/journal.pntd.0005298.

Dias, JCP, 2013. Human Chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. *J Trop Med*, 2013, 9p.

Dias, JCP, Prata, A, Coura, JR, 2008. Emmanuel Dias: o principal artífice do combate à doença de Chagas nas Américas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 502-504.

ELMAYAN, Ardem *et al.* High prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in shelter dogs from southern Louisiana, USA. *Paras Vectors*, v. 12, article 322. June 2019, DOI 10.1186/s13071-019-3572-y.

ENRIQUEZ, G. F., *et al.* Polyparasitism and zoonotic parasites in dogs from a rural area of the Argentine Chaco. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*, v. 16, n. 100287, April 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100287>.

ENRIQUEZ, G. F. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Trop*, v. 126, n. 3, p. 211-217, Mar 2013. DOI 10.1016/j.actatropica.2013.03.001.

Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbabosa A, et al. (2006) Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg Infect Dis* 12: 624–630. 10.3201/eid1204.050450

FERNANDES, Annielle Regina da Fonseca *et al.* Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. *Rev. Bras.*

Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 90-98, Mar. 2016. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016010>. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-

29612016000100090&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 set. 2019.

Figueira, CB, Takad, JPZ, Barbosa, GAF, Martins, KM, Araujo, LM, Souza, LB, Santos,

PCV, 2019. Reincidência da doença de Chagas no Brasil por vias alternativas de transmissão:

revisão sistemática. Revista de Patologia do Tocantins, 6, 61-64.

FREITAS, Yannara Barbosa Nogueira et al. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in

triatomines and seropositivity for Chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do

Norte, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 51, n. 2, p. 190-197, Apr. 2018. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2017>. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-

86822018000200190&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 set. 2019.

GALAVIZ-SILVA, Lucio *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small

mammals in Nuevo León, Mexico. Rev Argent Microbiol, v. 49, n. 3, p. 216-223. Jul-Sep

2017. DOI 10.1016/j.ram.2016.11.006.

GOMES, Monica L. *et al.* Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic,

molecular, and serologic methods. Am J Trop Med Hyg, v. 60, n. 2, p. 205-210, Feb 1999.

DOI 10.4269/ajtmh.1999.60.205.

Gurgel-Gonçalves, R, Galvão, C, Costa, J, Peterson, AT, 2012. Geografic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. J. Trop. Med. 2012, 1-15.

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

JANSEN, Ana Maria; XAVIER, Samanta Cristina das Chagas; ROQUE, André Luiz Rodrigues. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. Parasite Vectors, v. 11, n. 502, 2018. DOI 10.1186/s13071-018-3067-2.

Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, et al. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. Vet Parasitol 2008; 152:249–256.

LEÇA JUNIOR, Nilo Fernandes *et al.* First report of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from southern Bahia, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 182-185, Mar. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013005000003>.

LEONY, Leonardo M. *et al.* Performance of recombinant chimeric proteins in the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. PLoS Negl Trop Dis., v. 12, n. 6, p 1-16.. Jun 2019. DOI 10.1371/journal.pntd.0007545. e0007545.

Lima, L, Espinosa-Álvarez, O, Ortiz, PA, Trejo-Varón, JA, Carranza, JC, Pinto, CM6, Serrano MG, Buck, GA, Camargo, EP, Teixeira, MM, 2015. Genetic diversity of

Trypanosoma cruzi in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta tropica*, 151, 166-177.

LIMA, Marli M. *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 106, n. 3, Mar 2012, p. 143–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.013>.

Lucheis, S. B., Da Silva, A. V., Araújo Jr, J. P., Langoni, H., Meira, D. A., & Marcondes-Machado, J. (2005). Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11(4), 492-509. <https://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992005000400009>

Macedo, AM, Machado, CR, Oliveira, RP, Pena, SDJ, 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99, 1-12.

Machado EMM, Fernandes AJ, Murta SMF, Vitor RWA, Camilo DJ, et al. (2001) A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J Trop Med Hyg* 65: 958–965.

Marcili, A, Lima L, Valente, VC, Valente, SA, Batista, JS, Junqueira, AC, Souza, AI, da Rosa, JA, Campaner, M, Lewis, MD, Llewellyn, MS, Miles, MA, Teixeira, MM, 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1265–1274.

MEJÍA, A. et al. Serological evidence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs treated at veterinary clinics in the conurbation of Cuernavaca, Morelos. *Salud Publica Mex.* v. 59, n. 3, p. 205-206, 2017. DOI 10.21149/7945.

Mendes, RS., Santana, VL, Jansen, AM, Xavier, CC, Vidal, IF, Rotondano, TEF, Souza, AP, 2013. Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas canina no semiárido paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 33, 1459-1465.

MORAIS, Arielle N. et al. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.* v. 22, n. 2, p. 225-229, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013005000024>.

ORTIZ, S. et al. *Trypanosoma cruzi* diversity in infected dogs from areas of the north coast of Chile. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* v. 5, p. 42-47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.09.004>.

PEREZ, Taliha D. et al. Prevalence of American trypanosomiasis and leishmaniasis in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo*, v. 58, n. 79, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658079>.

PORFIRIO, Grasiela E. O. et al. Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian

border. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. v. 7, n. 3 p. 398-404, 2018. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.004>.

QUIJANO-HERNÁNDEZ, Israel A. et al. Evaluation of clinical and immunopathological features of different infective doses of *Trypanosoma cruzi* in dogs during the acute phase. The Scientific World Journal. v. 2012, 2011.

Ramírez, JD, Turriago, B, Tapia-Calle, G, Guhl, F, 2013. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. Vet. Parasitol. 196, 216-219.

REBÊLO, J.M.M.; BARROS, V.L.L.; MENDES, W.A. Espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do estado do Maranhão, Brasil. Rio de Janeiro. Caderno de Saúde Pública.v.14,n.1,p.187-192, 1998.

Rey, L. (3d. reimp), 2017. Bases da parasitologia médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 404p.

Roque, ALR, Jansen, AM, 2008. The importance of sentinel domestic animals to identify risk areas to the emergence of Chagas disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41, 191-193.

Roque, AL, Xavier, SC, Gerhardt, M, Silva, MF, Lima, VS, D'Andrea, PS, Jansen, AM, 2013. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba

municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Vet Parasitol.* 193, 71-77.

ROQUE, A. L. R., JANSEN, A. M. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, p. 75-87, 2014.

SALDAÑA A. et al. Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, v. 110, n. 7, p. 936-944, 2015. DOI 10.1590/0074-02760150284.

SANTOS, H. J. Um terço de memória, entre o Anjo da Guarda e Capela de Onça, e os heróis do Boi de Ouro: a história de fato e de direito do bairro Anjo da Guarda. São Luís: Lithograf, 2012.

Santos FL, Celedon PA, Zanchin NI, Brasil Tde A, Foti L, Souza WV, et al. Performance assessment of four chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0161100.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161100> eCollection 2016. PMID: 27517281

Santos FLN, Campos ACP, Amorim LDAF, da Silva ED, Zanchin NIT, Celedon PAF, et al. Highly accurate chimeric proteins for the serological diagnosis of chronic Chagas disease: A latent class analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99(5):1174–1179.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0727> PMID: 30226130

SOUZA, Graziela B. et al. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in dogs located in Ituberá, Southern Bahia, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 39, n. 2, p. 881-886, 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n2p881.

TAHIR, Djamel et al. Molecular and serological investigation of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in French Guiana. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*. v. 12, p. 106-109, 2017. DOI 10.1016/j.vprsr.2017.06.004.

Thrusfield M. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. Editora Roca, São Paulo. 556p.

Travi, L. Considering dogs as complementary targets of Chagas disease control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Feb 2019.90-94. <http://doi.org/10.1089/vbz.2018.2325>

Umezawa, ES, Souza, AI, Pinedo-Cancino, V, Marcondes, M, Marcili, A, Camargo, LM, Camacho, AA, Stolf, AM, Teixeira, MM, 2009. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*, 2009. *Acta Trop*. 111, 15–20.

Valente, VC, 2011. Estudo genotípico de *Trypanosoma cruzi*: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão. Instituto de Ciências Biológicas, 164p.

Veloso VM, Guedes PMM, Andrade IM, Caldas IS, Martins HR, et al. (2008) *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 528–534.

WHO, 2012. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. WHO: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Report 975.

WHO, 2018. Neglected tropical diseases. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 30 ago. 2019.

Xavier, SC, Roque, AL, Bilac, D, de Araújo, VA, da Costa Neto, SF, Lorosa, ES, da Silva, LF, Jansen, AM, 2014. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. PLoS Negl Trop. Dis. 8, 2878.

XAVIER S. C. C. et al. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. PLoS Negl Trop Dis. v. 6, n. 5, 1647, 2012. DOI 10.1371/journal.pntd.0001647.

ZAMORA-LEDESMA, S. et al. Presence of trypanosomatid antibodies in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Queretaro, Mexico. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports. v. 5, p. 25-30, 2016. DOI 10.1016/j.vprsr.2016.08.005.

Zingales, B, Miles, MA, Campbell, DA, Tibayrenc, M, Macedo, AM, Teixeira MMG, Schijman, AG, Llewellyn, MS, Lages-Silva, E, Machado, CR, Andrade, SG, Sturm, NR, 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 12,240–253.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a),

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar da pesquisa intitulada "**Estudo dos hospedeiros domésticos e silvestres de *Leishmania infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi* em área de ocorrência de Leishmaniose e Doença de Chagas no Estado do Maranhão, Brasil**", sob responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa e Mestranda Ana Vitória Verde Oliveira Rocha e Thaliane França Costa. Este estudo tem como objetivo verificar a ocorrência dos agentes causadores da Leishmaniose Visceral e Doença de Chagas em animais domésticos e silvestres no bairro Anjo da Guarda, a fim de conhecer a situação das doenças citadas nesta região.

Sua participação é voluntária e consiste em responder a um questionário epidemiológico; permitir a instalação de armadilhas no terreno da sua residência, para captura de animais silvestres, e; autorizar a colheita de sangue dos animais domésticos de sua tutoria. Sua participação terá como benefício a realização de exames diagnósticos da Leishmaniose Visceral e da Doença de Chagas no(s) seu(s) animal(is), sendo os resultados disponibilizados para seu conhecimento. Ainda, você estará contribuindo indiretamente para a produção de conhecimento científico.

Você não terá nenhuma despesa e não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, declaro que fui devidamente informado (a) sobre os objetivos e procedimentos do projeto de pesquisa de responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa e Mestranda Ana Vitória Verde Oliveira Rocha e Thaliane França Costa pesquisadores e sobre a importância da minha colaboração. Por isto, consinto em participar desta pesquisa, sabendo que não terei nenhum gasto e remuneração.

Assinatura do participante

Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE 2

QUESTIONÁRIO

I. ASPECTOS PESSOAIS (Responsável pelo domicílio)

1. Nome: _____ 2. Idade: _____ 3. Sexo: () M () F

4. End: _____
nº _____

5. Escolaridade:

() Analfabeto () Fundamental incompleto () Fund. Completo () Médio incompleto

() Médio completo () Superior incompleto () Superior completo
_____**II. ASPECTOS AMBIENTIAIS**

1. Tipo de moradia: () Alvenaria c/ reboco; () Alvenaria s/ reboco; () Madeira

2. Área peri-domicilar: () Somente residências; () Terreno baldio () Área de mata

Outros: _____

	Lixo de mat. Orgânicas	Árvores frutíferas	Outros
Domicílio			
Peri-domicílio			

3. Cria algum tipo de animal na casa ou no terreno? (Marcar no espaço a quantidade de animais de cada espécie)

() Não cria () Cão () Gato () Porco () Aves () Coelho () Jabuti

() Outro _____

4. No caso dos cães e gatos, eles têm acesso ao quintal da casa e/ou à rua?

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
Ao quintal					
À rua					
Não saem da casa					

5. Observa a presença de outros animais no quintal?

() Nenhum () Mucura () Rato () Morcego () Camaleão

() Outro _____