

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma caninum* em cães atendidos no
Hospital Veterinário da UFCG

Laysa Freire Franco e Silva

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma caninum* em cães atendidos no
Hospital Veterinário da UFCG

Laysa Freire Franco e Silva

Graduanda

Prof^a. Dr^a. Marcia Almeida de Melo

Orientadora

Patos-PB

Dezembro/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

S586p Silva, Laysa Freire Franco e
Pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma caninum* em cães atendidos
no Hospital Veterinário da UFCG / Laysa Freire Franco e Silva. – Patos,
2015.
29f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) -
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia
Rural, 2015.

“Orientação: Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo”

Referências.

1. Tripanossomatídeos. 2. Diagnóstico parasitológico.
3. Nordeste. 4. Sorologia. I. Título.

CDU 614

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LAYSA FREIRE FRANCO E SILVA

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADA EM: 10/12/2015

MÉDIA: DEZ

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof ^a . Dr ^a . Marcia Almeida de Melo ORIENTADORA	DEZ Nota
_____ Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino EXAMINADOR I	DEZ Nota
_____ Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo EXAMINADOR II	DEZ Nota

“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste.”

Sigmund Freud

À Deus, por ter me presenteado com sua benevolência, sempre;

Aos meus pais, Socorro e Cícero, por todo amor, dedicação, suporte, exemplo e crença;

À minha Vó, Lourdes, por ser meu pedacinho de céu na Terra;

Aos meus irmãos, Lindsay e Líneker, por terem trilhado e me mostrado o caminho a ser seguido;

Ao meu amor, Rafael, por ter feito tudo e ser tudo para mim;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Deus, veio o Senhor, outra vez, me entregar mais um pouquinho do seu amor infinito, obrigada por me permitir dar mais esse passo em minha vida, em busca do futuro que sonhei, o Senhor não para, não para de me fazer bem, de encher meu coração de gratidão, de me apontar sempre o rumo certo, eu te agradeço!

Agradeço aos meu pais, Maria do Socorro e Cícero Antônio, que carregam esses nomes simples e os corações mais bonitos que já conheci. Quanta beleza há na simplicidade e quanto amor há entre nós! Obrigada por serem assim, amorosos, dedicados, firmes, por fazerem sempre o melhor por mim, vocês estão sempre aqui comigo ou logo adiante, nunca me deixam sozinha. Obrigada por me mostrarem que eu posso ser como sou e chegar onde quero com meus esforços, mas que sempre posso voltar para casa se preciso, quando o coração pedir. Como é bom ter vocês em minha vida. Meu amor por vocês é eterno!

Aos meus irmãos, Lindsay e Líneker, por serem exemplo e por terem me apoiado e incentivado a chegar até aqui. Agradeço ao meu irmão por mostrar que o esforço é sempre recompensado e a minha irmã por ter sido um pouco minha mãe, por ter me dado tanto amor e por ter colocado Miguel em minha vida, o sobrinho que me enche de alegria e paz. Amo muito vocês!

Obrigada a minha irmãzinha caçula, Lela, que viveu comigo durante 13 anos e me presenteou com o amor mais puro e leal, agradeço por ter me acordado todos os dias com seu focinho gelado durante a época de escola e por ter plantado em mim a sementinha do amor por animais que me guiou ao caminho que trilho hoje com muita alegria, você é eterna para mim Lelinha, eterna!

A minha Vozinha, Lourdes Brito, a pessoa mais especial que existe em minha vida, ninguém acalma meu espírito como a senhora Vó, para mim, não há ninguém igual! Agradeço por todos os conselhos, pelas orações e por todo amor que me dá, eu te amo daqui até o infinito! Obrigada aos meus tios e tias, primos e primas, toda minha família, por todo apoio e torcida, vocês são especiais demais para mim!

Ao meu marido, Rafael, por todo amor, paciência, incentivo, apoio, cuidado. Obrigada, meu amor, por ter caminhado junto comigo todo o tempo, por ter me dado forças e por nunca me deixar desistir de nada, muito menos dos meus sonhos! Você é essencial para mim e eu te amo, muito mesmo!

Aos meus amigos de turma, Juliette, Héric, Sóstenes, Carla, Luanna, Aline e Camila, por terem sido uma família para mim! Agradeço o carinho, os favores, as brigas, os conselhos, o incentivo, todas as horas de estudo, os desabafos, as risadas. Agradeço aos amigos do Laboratório, Raizza, Diana, Saul, Marília, Heitor e Viviane, por todo o conhecimento trocado, pelas horas de trabalho e aprendizado, pelo apoio e colaboração. Vocês fazem parte da minha vitória, não teria chegado aqui sem vocês!

A minha orientadora, Márcia Almeida de Melo, por ter me apresentado ao mundo da Imunologia, pela oportunidade de crescimento acadêmico e conhecimento transferido, pelos conselhos e confiança em mim depositada. Agradeço o apoio e incentivo!

Ao professor, Gildenor Xavier, que, na minha primeira fraqueza e indecisão a respeito dessa profissão tão bonita, soube me dizer o que eu precisava ouvir “você vai poder aliviar as dores deles”, obrigada pelo incentivo e gentileza com que sempre me tratou professor!

Ao professor, Pedro Izidro, por todos os conselhos dados, desde que pisei pela primeira vez no Hospital Veterinário. A minha iniciação científica começou com o senhor, me dando orientações a respeito do meu primeiro projeto. Agradeço por todos os “entre!” sempre que bati em sua porta. O senhor é um exemplo de pessoa e profissional e uma das minhas inspirações para seguir nesse caminho. Obrigada por tudo professor!

A todos os professores dos mais exigentes, que me deram incentivo para crescer e dar sempre o meu melhor, aos mais carinhosos, que me fizeram sentir querida e em família pelo amor recebido. Foi uma honra receber os ensinamentos de profissionais tão bem preparados!

Enfim, a todos que contribuíram e fizeram parte dessa trajetória.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 <i>Trypanosoma caninum</i>.....	14
2.2 Características de <i>T. caninum</i>.....	14
2.3 Reação cruzada entre o <i>T. caninum</i> e outros tripanossomatídeos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Local.....	19
3.2 Animais.....	19
3.3 Isolamento de <i>Trypanosoma caninum</i> a partir de pele intacta.....	19
3.4 Provas sorológicas.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotomicrografias de cultura de <i>Trypanosoma caninum</i> (stock A-27).....	15
Figura 2. Coleta do fragmento de pele.....	20
Figura 3. Fragmento em meio NNN/LIT.....	20
Figura 4. Coleta do sangue	21
Figura 5. Distribuição dos municípios da Paraíba.....	23

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Resultado dos testes sorológicos para <i>T. caninum</i> e <i>L. infantum</i> , segundo o município de origem, no período de fevereiro a agosto de 2015.....	25

RESUMO

SILVA, LAYSA FREIRE FRANCO. Pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma caninum* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFCG. Patos, UFCG, 2015. 29p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária).

Trypanosoma caninum é uma nova espécie de tripanossomatídeo que infecta cães e tem sido relatado em áreas onde ocorre leishmaniose visceral e doença de Chagas. Diante do diagnóstico do parasita em novas regiões do Brasil, objetivou-se evidenciar a presença de anticorpos anti-*T. caninum* em animais atendidos no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande. A pesquisa do parasita foi realizada em 55 animais provenientes de municípios da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Foram realizados cultivos de fragmentos de pele em meio NNN/LIT, ELISA *in house* para detecção de anticorpos anti-*T. caninum* e o ELISA S7® para verificar co-infecção com *L. infantum*. Na cultura, não foi isolado *T. caninum* em nenhum dos animais avaliados. Pelo ELISA, seis (10,9%) animais foram positivos e 9 (18%) foram indeterminados para *T. caninum*. Para a infecção por *L. infantum*, seis (10,9%) e três (5,45%) foram positivos e indeterminados, respectivamente. Um animal positivo para *T. caninum* foi indeterminado para *L. infantum*. É possível que animais dos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte tenham sido expostos ao contato com *Trypanosoma caninum*.

Palavras chave: Tripanossomatídeos, diagnóstico parasitológico, Nordeste, sorologia.

ABSTRACT

SILVA, LAYSA FREIRE FRANCO. Identification of antibody anti-*Trypanosoma caninum* of dogs attended in the Veterinary Hospital from UFCG. Patos, UFCG, 2015. 29 pgs. (Monography in Veterinary Medicine).

Trypanosoma caninum is a new species of trypanosomatid that infects dogs and has been reported in areas where there is visceral leishmaniasis and Chagas' disease. As the parasite was identified in some regions in Brazil, this work aimed to verify the presence of antibody anti-*T. caninum* in animals attended in the Veterinary Hospital from Centro de Saúde e Tecnologia Rural, at Universidade Federal de Campina Grande. The parasite survey was conducted in 55 animals from municipalities of Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte. For parasite isolation, skin fragments were seeded in NNN/LIT medium. For detecting anti-*T. caninum* and anti-*L. infantum* antibodies, it were conducted an ELISA and ELISA S7®, respectively. *T. caninum* was not isolated from skin fragments. By ELISA, six (10.9%) animals were positive and 9 (18%) were indeterminate to *T. caninum*. By ELISA S7®, six (10.9%) and three (5.45%) animals were positive and indeterminate, respectively. A positive animal for *T. caninum* was undetermined for *L. infantum*. It is possible that animals of the states of Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte have been exposed to contact with *Trypanosoma caninum*.

Keywords: Trypanosomatid, parasitological diagnosis, Northeast, serology.

1 INTRODUÇÃO

Trypanosoma caninum é uma nova espécie de *Trypanosoma* descrita em 2003, no município do Rio de Janeiro. O agente foi isolado da pele intacta de um cão doméstico e, aparentemente, não é patogênico (MADEIRA et al., 2009). Até o momento, 62 casos de infecção natural por *T. caninum* foram registrados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015); todos os isolados da espécie possuem homogeneidade genética, apresentando-se idênticos ou bastante semelhantes (BARROS et al., 2012, BARROS; TOMA; MADEIRA, 2015).

A presença de *T. caninum* pode representar um fator de confusão no diagnóstico de cães infectados com outros tripanossomatídeos, como os protozoários *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas canina (DCC), e *Leishmania infantum*, causador da leishmaniose visceral canina (LVC), já que o diagnóstico de ambos, sobretudo em trabalhos de prevalência, é realizado sempre por sorologia. *T. caninum*, ainda que pouco imunogênico, pode estimular resposta humoral específica, mas com possibilidade de reação cruzada em testes sorológicos (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010; SILVA et al., 2011; ALVES et al., 2012).

A identificação de *Trypanosoma caninum* e *T. cruzi* em áreas de sobreposição com a LVC pode interferir no controle desta doença, já que as ações de controle incluem a eutanásia de cães soropositivos (SILVA et al., 2011).

As reações sorológicas cruzadas entre estas protozooses ainda carecem de maior investigação para permitir conclusões acertadas quanto à prevalência das três infecções nas áreas onde elas são co-endêmicas. Há apenas um relato sobre a existência desta nova espécie na região Nordeste, descrito no estado do Piauí. Diante do crescente diagnóstico desse parasito, o presente trabalho teve por objetivo evidenciar a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma caninum* em animais atendidos no Hospital Veterinário da UFCG.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma caninum*

A família *Trypanosomatidae* é constituída por protozoários flagelados que incluem os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, causadores de doenças importantes em humanos (STUART et al., 2008). Estes protozoários pertencem à ordem Kinetoplastida, por possuírem o cinetoplasto, uma organela que contém DNA extranuclear (LANA; TAFURI, 2010).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, e a *Leishmania donovani*, da leishmaniose visceral, têm sido detectados em animais silvestres e domésticos, incluindo os cães, sendo estes considerados os principais reservatórios domésticos da infecção humana por esses dois parasitos (AGUIAR, 2008).

Em 2009, no município do Rio de Janeiro, Madeira et al. identificaram a presença de uma nova espécie do gênero *Trypanosoma* em um cão doméstico co-infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (protozoário causador da leishmaniose tegumentar), o agente foi nomeado de *Trypanosoma caninum*. Posteriormente, também foi relatado em outras áreas do município do Rio de Janeiro, em Cuiabá, no Mato Grosso, em São Paulo, em Minas Gerais, em Goiás e no Piauí, com sobreposição em áreas com *L. infantum* e *T. cruzi* (BORGES-PEREIRA, 2002; PINTO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011; SILVA et al., 2011; BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Até o momento, 62 casos de infecção natural por *T. caninum* foram registrados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e, mais recentemente, Nordeste (BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). As sequências de DNA ribossomal mostraram que todos os isolados de *T. caninum* descritos, até então, são geneticamente idênticos ou muito semelhantes (BARROS et al., 2012) e, analisando regiões distintas do genoma de *T. caninum* utilizando diferentes marcadores moleculares, Barros, Toma e Madeira (2015) observaram homogeneidade genética na espécie.

2.2 Características de *T. caninum*

T. caninum foi isolado exclusivamente em cultura a partir de fragmentos de pele intacta, característica incomun entre os representantes do gênero *Trypanosoma*. Até o momento, tentativas de isolá-lo por hemocultura ou a partir de outros tecidos não

tiveram êxito, reforçando a sugestão de que o parasita tem preferência em habitar tecidos e vasos sanguíneos periféricos (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010). Os parasitas do gênero *Trypanosoma* geralmente não são procurados na pele, o que pode explicar a razão desta espécie não ter sido identificada anteriormente (BARROS et al., 2012).

T. caninum é facilmente isolado e cultivado em culturas axênicas, sendo observadas formas evolutivas epimastigotas (forma predominante), tripomastigotas, esferomastigotas e formas em fases de transição, podendo ser distinguido de outras tripanossomatídeos que ocorrem em mamíferos, pelo tamanho do corpo e do cinetoplasto de formas tripomastigotas (MADEIRA et al., 2009).

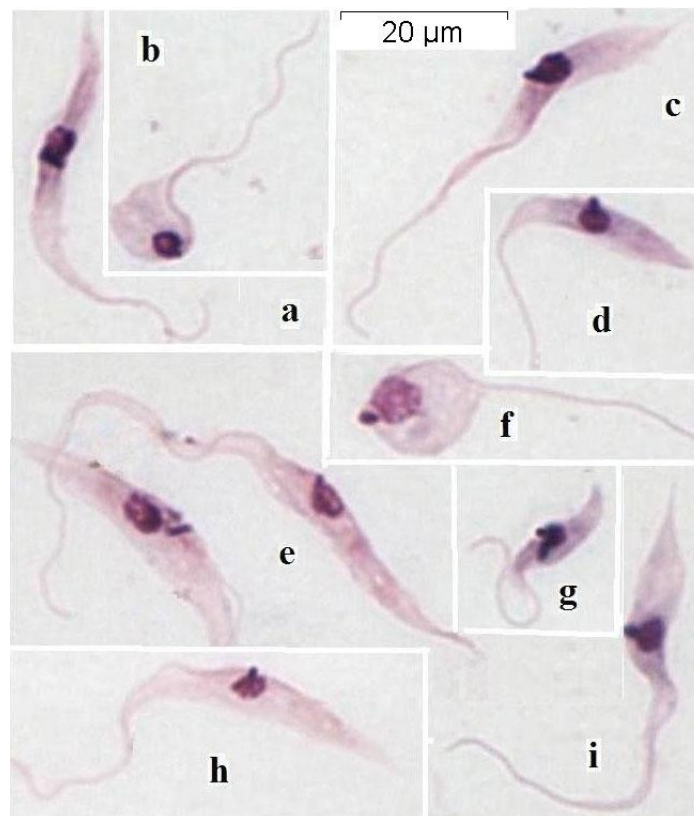


Figura 1: Fotomicrografias de cultura de *Trypanosoma caninum* (stock A-27). Epimastigotas (a, c, d, e, h, i). Esferomastigotas (b, f). Epimastigotas em divisão (g). Cinetoplastos arredondado do epimastigotas e em posição posterior em relação ao núcleo do esferomastigota. Fonte: Madeira et al. (2009).

Barros et al. (2014) descreveram ainda formas epimastigotas aflageladas. Os autores observaram que algumas destas formas desenvolveram flagelos ao longo do tempo enquanto outras se mantiveram aflageladas sem que isto prejudicasse seu crescimento. Isso levantou a hipótese de que os epimastigotas aflagelados podem ser

encontrados em alguma fase do ciclo biológico do parasita ou que o surgimento dessas formas poderia ser resultado de perturbações durante o processo de divisão celular por interferência em proteínas específicas, impedindo a formação e regulação do comprimento do flagelo.

O parasita difere de *T. cruzi* por não apresentar infecciosidade para macrófagos e triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. A impossibilidade de infectar triatomíneos pode sugerir que outros artrópodes atuem como vetores, como ocorre no ciclo de outras espécies de tripanossomas (MADEIRA et al., 2009).

T. caninum é pouco imunogênico, aparentemente não é patogênico ou pouco virulento para cães. Apresenta curso de infecção assintomático ou sem sinais clínicos relevantes e transitório, com baixa parasitemia, tornando difícil sua detecção pelos métodos de diagnóstico utilizados até o momento (ALMEIDA, 2012; ALVES et al., 2012; MADEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

2.3 Reação cruzada entre o *T. caninum* e outros tripanossomatídeos

A presença de *T. caninum* pode representar um fator de confusão no diagnóstico de cães infectados com tripanossomatídeos, como os do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*, já que pesquisas para identificação de animais positivos são baseadas em ferramentas sorológicas. *T. caninum*, ainda que pouco imunogênico, estimula resposta imune humoral específica, entretanto, pode provocar reação cruzada em testes sorológicos (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010; SILVA et al., 2011; ALVES et al., 2012).

A transmissão vetorial da doença de Chagas permanece sob controle no Brasil, com a virtual erradicação do *Triatoma infestans*. Apesar disso, no baixo Sertão Paraibano, casos esporádicos de doença de Chagas aguda humana têm sido registrados. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, ocorreram 10 casos agudos de Doença de Chagas entre 2007 e 2009, distribuídos nos municípios de Patos, Teixeira e Desterro.

Em um estudo recente, Santana (2011) apontou a presença de infecção por *T. cruzi* em uma porcentagem expressiva de cães das áreas rurais de Patos, Teixeira e Caicó; esta última no Estado do Rio Grande do Norte. Os dados em conjunto apontam para o potencial do cão como reservatório da doença de Chagas humana nas novas condições epidemiológicas do Nordeste, onde predominam casas de alvenaria e onde a

população tem uma renda per capita e uma qualidade de vida muito superiores às aquelas prevalentes ao tempo em que a transmissão vetorial era comum.

A leishmaniose visceral persiste como um importante problema de saúde pública no Brasil, apesar dos esforços para seu controle por parte das três esferas de governo. Desde a década de 80 casos urbanos e periurbanos têm sido registrados com crescente frequência e, apesar da falta de levantamentos mais abrangentes no Brasil, é consenso que na última década tem havido um aumento da prevalência da infecção tanto em cães como em humanos. No Sertão, a infecção endêmica pode tornar-se epidêmica quando se reveste de caráter urbano, como registrado em Petrolina (PE), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Caicó (RN), Mossoró (RN) e outras cidades de clima semiárido (CESSE, 1999; MATOS et al., 2006; BATISTA, 2008). A prevalência da infecção canina é importante indicativo de risco e seu estudo aponta às agências e órgãos de controle locais e ações necessárias ao controle da endemia.

O impacto de *T. caninum* sobre as estratégias de controle para LVC que estão sendo empregadas no Brasil deve ser avaliado (MADEIRA et al., 2014) já que o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia de cães sororreativos, especialmente em áreas endêmicas (BRASIL, 2006).

Estudos realizados por Pinto et al. (2010) e Silva et al. (2011) relatam o isolamento de *T. caninum* em cães soropositivos para *Leishmania* submetidos à eutanásia, entretanto, não houve isolamento de *Leishmania infantum* nestes animais. A ocorrência de resultados falso-positivos e a eficácia desta metodologia de controle está sendo discutida, tornando visível a necessidade de técnicas mais precisas, com maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico da LVC (ALMEIDA, 2012; ALVES et al., 2012).

A sorologia não tem se demonstrado como melhor método para o diagnóstico e rastreamento de *T. caninum*, em contrapartida o isolamento e testes moleculares através de fragmentos de pele são técnicas aconselháveis para seu diagnóstico (MADEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2012; PINTO et al., 2014; BARROS; TOMA; MADEIRA, 2015). O escasso conhecimento sobre *T. caninum* limita a escolha das amostras biológicas para serem analisadas e de ferramentas mais adequadas para sua identificação, tornando importante a combinação de métodos de diagnóstico (MADEIRA et al., 2014).

Diante da necessidade de mais informações acerca de *T. caninum* para auxiliar nas estratégias de controle da LVC, novos estudos devem ser realizados para o esclarecimento de aspectos relacionados ao ciclo epidemiológico, diagnóstico e à prevalência deste agente. Ainda que *T. caninum* pareça não causar alterações clínicas ou dermatológicas nos animais infectados, o conhecimento das formas de transmissão e manutenção do parasito na natureza é imprescindível, especialmente nas áreas onde as leishmanioses caninas estão presentes (ALMEIDA, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CSTR, número de protocolo CEP 238/2015.

3.1 Local

As análises laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, localizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (HV/UFCG), Campus de Patos – PB e no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz /FIOCRUZ.

3.2 Animais

As coletas foram realizadas no período de fevereiro a agosto de 2015 em cães da rotina clínica do HV/UFCG, Campus de Patos – PB, obtidos junto aos proprietários que buscaram atendimento cirúrgico para os animais, independente do município de origem. O tamanho amostral foi de 55 cães, de ambos os sexos e idade igual ou superior a seis meses. Os proprietários assinaram um Termo de Autorização, consentindo a participação de seu animal no estudo.

3.3 Isolamento de *Trypanosoma caninum* a partir de pele intacta

Foram coletados fragmentos de pele integra da região onde foi realizada a incisão cirúrgica (Figura 2). Para isto, realizou-se tricotomia e antissepsia da área e o animal foi devidamente anestesiado de acordo com o tipo específico de cirurgia a qual seria submetido. A antissepsia foi realizada com clorexidina alcoólica a 0,5%.

Os fragmentos tiveram tamanho médio de 3 mm e foram processados para exames parasitológicos (cultura).

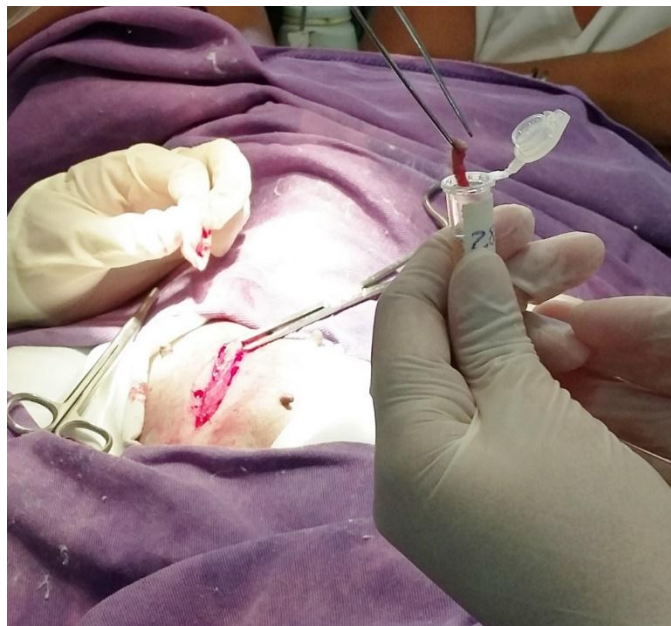


Figura 2: Coleta do fragmento de pele. Fonte: Arquivo pessoal (2015).

O isolamento foi baseado em Madeira et al. (2009), que consiste em previamente manter o fragmento do tecido imerso em salina com os antibióticos penicilina (1000 UI/mL), estreptomicina (200 $\mu\text{g/mL}$) e o antifúngico fluorocitosina (50 $\mu\text{g/mL}$), por 24 horas a 4°C. O fragmento era depois transferido para meio NNN/LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubado a 27°C (Figura 3). As culturas foram acompanhadas por um mês com repiques com intervalos de sete dias.

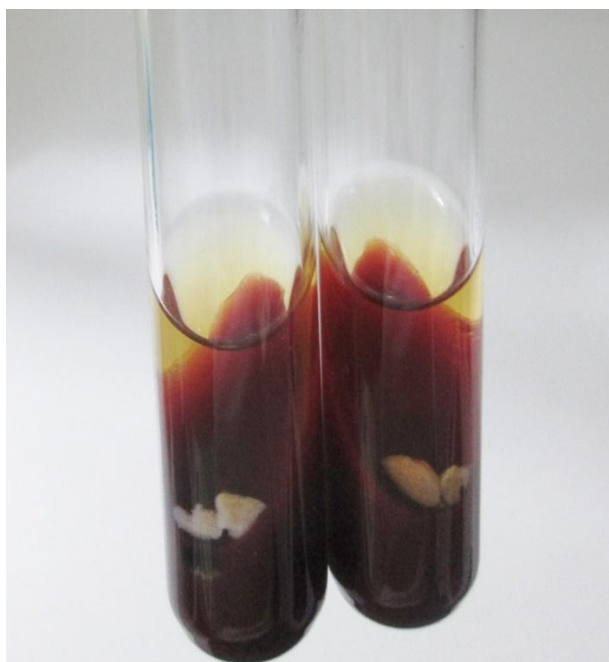


Figura 3: Fragmento em meio NNN/LIT. Fonte: Arquivo pessoal (2015).

3.4 Provas sorológicas

De cada animal, foram obtidos 3 mL de sangue por punção da veia cefálica para realização de provas sorológicas (Figura 4). O plasma foi congelado a -20°C até a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA).



Figura 4: Coleta do sangue. Fonte: Arquivo pessoal (2015).

Os anticorpos anti-*T. caninum* foram detectados e quantificados por ELISA de acordo com Alves et al. (2012), utilizando formas de cultivo axênico de *T. caninum*. O teste apresenta sensibilidade e especificidade de 94,9% e 35,9%, respectivamente. A reação foi revelada utilizando-se 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e a densidade óptica (DO) da reação avaliada em absorbância (450nm) utilizando espectrofotômetro de microplaca de ELISA (Genious -Tecan®).

Os resultados do ELISA foram apresentados em unidades arbitrárias (UA) que correspondem à razão entre a densidade óptica da amostra e a média das DOs dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão (DP). Os resultados definidos pelo valor de UA abaixo de 1,0 foram definidos como negativos, resultados maior ou igual a 1,0 e menor ou igual 1,2 foram considerados como indeterminados e acima de 1,2 como positivos.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania donovani* foi realizada através do ELISA S7¹ seguindo as instruções do fabricante. O antígeno é recombinante e

¹ Biogene Ind. & Com. LTDA

constituído da região carboxi-terminal da HSP70 da *L. donovani*. O kit é autorizado pelo Ministério da Agricultura para diagnóstico do calazar canino e possui 97% de sensibilidade e 90% de especificidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas amostras de cães atendidos no setor de cirurgia do HV/UFCG, Campus de Patos – PB, oriundos de Patos/PB (39), São Bento/PB (2), Taperoá/PB (2), Monteiro/PB (1), Piancó/PB (1), Catolé do Rocha/PB (1), Pombal/PB (1), Sousa/PB (1), Imaculada/PB (1), Teixeira/PB (1) (Figura 5), Afogados da Ingazeira/PE (1), São José do Egito/PE (2), São João do Sabugi/RN (1) e Timbaúba dos Batistas/RN (1).

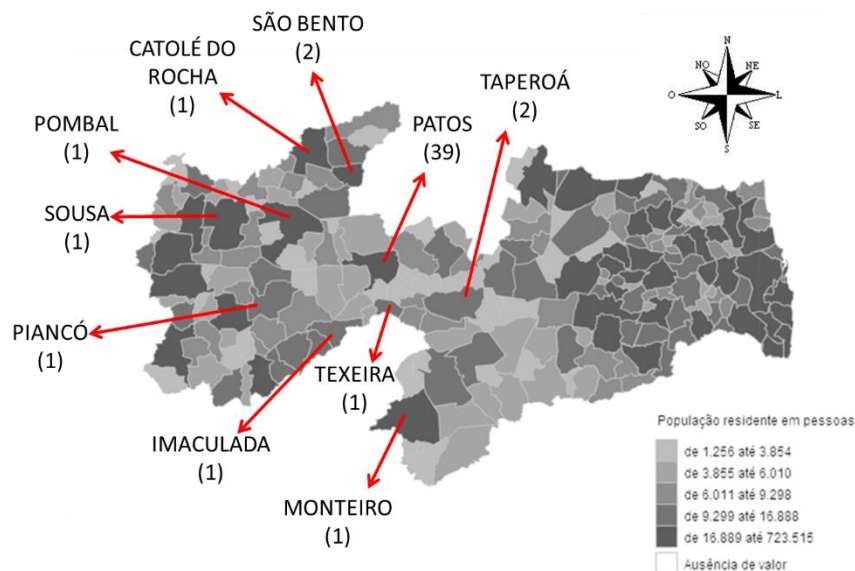


Figura: Distribuição dos municípios da Paraíba. Fonte: Modificado do IBGE (2015).

Através da cultura de fragmento de pele, não foi isolado *T. caninum* em nenhuma das 55 amostras mantidas no meio NNN/LIT, entretanto não se descarta a possibilidade de que os animais tenham sido infectados pelo agente em um período anterior.

A pele íntegra foi o local onde o parasito foi isolado pela primeira vez (MADEIRA et al., 2014), entretanto vários fatores podem dificultar o isolamento deste agente. Como o parasito se localiza na superfície da pele, a antisepsia realizada anteriormente à retirada do fragmento pode ter influenciado na quantidade de organismos viáveis. O *T. caninum* é de difícil isolamento, Pinto et al. (2010) obtiveram apenas 19 isolados em um total de 400 amostras de pele íntegra, correspondendo a apenas 4,75 por cento.

O isolamento por cultivo é uma técnica pouco sensível. Pinto et al. (2014) relataram que os ensaios baseados em PCR foram mais sensíveis que os testes de cultura para diagnóstico de *T. caninum*, apresentando 25 resultados positivos, enquanto

apenas 11 casos foram identificados utilizando a cultura. Além disto, a infecção por *T. caninum* tem caráter transitório, Madeira et al. (2014) e Oliveira et al. (2015) não conseguiram reisolar o agente depois de 6 a 12 meses após o isolamento inicial.

O isolamento e manutenção de culturas são fundamentais no estudo e descrição de novas espécies de tripanossomatídeos (MADEIRA et al., 2009). Segundo Almeida (2012), a caracterização das amostras isoladas através do diagnóstico parasitológico é muito importante, especialmente em estudos que envolvem a vigilância epidemiológica, pois permite o mapeamento das espécies em áreas endêmicas.

Os cães domésticos podem ser infectados por diferentes membros da família Trypanosomatidae e até mesmo ter coinfeções, o que torna necessária a adoção de técnicas de diagnóstico que discriminem, com segurança, os agentes etiológicos envolvidos, especialmente em áreas endêmicas onde há sobreposição dos agentes (ALMEIDA, 2012; ALVES et al., 2012). No caso da leishmaniose visceral canina, no Brasil, umas das medidas de controle é a identificação dos cães infectados através de técnicas sorológicas e posterior eutanásia dos animais positivos (BRASIL, 2006).

Quanto aos resultados dos ensaios sorológicos, dos 55 animais avaliados, seis (10,9%) apresentaram resultados positivos e 9 (18%) foram indeterminados no teste de ELISA para *T. caninum*, no entanto, devido a baixa especificidade do teste, existe a possibilidade de resultados falso-positivos, necessitando de confirmação por outras técnicas, como a PCR. Para a infecção por *L. infantum*, seis (10,9%) e três (5,45%) foram positivos e indeterminados, respectivamente, no ELISA S7 (Tabela 1). Apenas o animal 49 foi positivo para *T. caninum* e indeterminado para *L. infantum* sugerindo coinfeção ou reação cruzada entre ambos parasitos, entretanto não foi possível reavaliá-lo para confirmação dos resultados.

Os animais sorologicamente positivos para *T. caninum* tinham a faixa etária entre 8 meses e 12 anos, sendo em sua maioria entre 8 a 12 anos, entre estes 4 eram fêmeas e 2 machos. Os animais com resultado indeterminado estavam com idade entre 6 meses e 8 anos, dos 9 animais, 8 eram fêmeas. Madeira et al. (2014) verificou, em 14 cães naturalmente infectados, idades variando entre 8 meses e 8 anos, no entanto, foi observada predominância da infecção em animais do sexo masculino.

Tabela 1: Resultado dos testes sorológicos para *T. caninum* e *L. infantum*, segundo o município de origem, no período de fevereiro a agosto de 2015.

Testes Sorológicos	Positivos (%)	Município	Indeterminados (%)	Município
ELISA <i>T. caninum</i>	4 (7,27%)	Patos	9 (16,36%)	Patos
	1 (1,81%)	Afogados da Ingazeira		
	1 (1,81%)	São João do Sabugi		
ELISA S7	5 (9,09%)	Patos	3 (5,45%)	Patos
	1 (1,81%)	São José do Egito		

A existência de *T. caninum* em áreas onde ocorre LVC pode ser um fato preocupante porque os dois patógenos são membros da família Trypanosomatidae. Entretanto, de acordo com Alves et al. (2012), 100% dos animais com *L. infantum* foram corretamente diagnosticados utilizando os ensaios empregados atualmente pelo Ministério da Saúde, isto é, Dual-Path Platform (DPP) como triagem e EIE-Leishmaniose visceral canina como confirmatório. Por outro lado, considerando o ELISA como teste de triagem e imunofluorescência indireta como confirmatório para LVC, 23% dos animais infectados por *T. caninum* seriam, equivocadamente, diagnosticados como positivos para *L. infantum*.

5 CONCLUSÃO

Em função da baixa especificidade do teste de ELISA e do não isolamento do *T. caninum*, necessita-se de ensaios complementares para afirmar se os cães foram expostos ao parasito.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. S. **Aplicações dos sorotestes ELISA e Western blotting na avaliação de reatividade cruzada no diagnóstico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* em soros caninos de área endêmica na Bahia**. Salvador: UFBA, 2008. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

ALMEIDA, A. B. P. F. **Ocorrência de *Leishmania chagasi* e outros tripanosomatídeos em cães de Cuiabá, Mato Grosso: avaliação clínica e uso de diferentes métodos de diagnóstico laboratorial**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012. 11 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em ciências.

ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; SORTE, E. C. B.; FIGUEIREDO, F. B.; DE PAULA, D. A. J.; PIMENTEL, M. F. A.; DUTRA, V.; MADEIRA, M. F. Use of parasitological culture to detect *Leishmania chagasi* in naturally infected dogs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.12, 2011.

ALVES, A.S; MOUTA-CONFORT, E; FIGUEIREDO, F.B; OLIVEIRA, R.V.C; SCHUBACH, A.O; MADEIRA, M.F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**. v.93, p.1329–1333, 2012.

BARROS, J. H. S.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FIGUEIREDO, F. B.; SOUSA, V. R. F.; FAGUNDES, A.; PINTO, A. G. S.; BAPTISTA, C.; MADEIRA, M. F. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in in áreas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.419-423, 2012.

BARROS, J.H.S; FONSECA, T.S; MACEDO-SILVA, R.M; CORTÊ-REAL, S; TOMA, H.K; MADEIRA, M.F. Aflagellar epimastigote forms are found in axenic culture of *Trypanosoma caninum*. **Acta Tropica**, v.137, p.147-151, 2014.

BARROS, J.H.S; TOMA, H.K; MADEIRA, M.F. Erratum to: Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers, **Parasitology Research**, v.114, p.1645, 2015.

BATISTA, M. G. N.; **Levantamento de leishmaniose visceral no município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil: soroprevalência de risco e isolamento do agente**. Monografia do Curso de Especialização. Saúde Pública Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil, 2008. 51p.

BORGES-PEREIRA, J; CASTRO, J.A.F; SILVA, A.G; ZAUZA, P.L; BULHÕES, T.P; GONÇALVES, M.E; ALMEIDA, E.S; SALMITO, M.A; PEREIRA, L.R.M; FILHO, F.I.A; CORREIA-LIMA, F.G; COURA, J.R. Soroprevalência da infecção chagásica no Estado do Piauí, 2002, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.530-539, 2006.

CESSE, E. A. P. **Expansão e Urbanização da Leishmaniose Visceral: Estudo Epidemiológico do Processo de Transmissão Ativa em Área Urbana – Petrolina – PE, 1991-1997.** Tese de Mestrado. (Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães – Departamento de Saúde Coletiva) Recife – PE – Brasil, 1999. p.150.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D.P (Org.) **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 85- 108.

MADEIRA, M. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, J. H. S.; OLIVEIRA, T. S. F.; SOUSA, V. R. F.; ALVES, A. S.; MIRANDA, L. F. C.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, M. Z. A. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. **Journal of Parasitology**, v.100, p.231-234, 2014.

MADEIRA, M. F.; SOUSA, M. A.; BARROS, J. H. S.; FIGUEIREDO, F. B.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; DE PAULA, C. C.; FAISSAL, B. N. S.; FONSECA, T. S.; THOMA, H. K.; MARZOCHI, M. C. A. *Trypanosoma caninum*. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology**, v.136, p. 411-423, 2009.

MATOS, M. M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N. D. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n.1, p. 51-54, 2006.

OLIVEIRA, T.S.F; BARROS, J.H.S; PEREZ, T.D; FIGUEIREDO, F.B; JÚNIOR, A.A.V.M; MADEIRA, M.F. Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p.347-349, 2015.

PINTO, A. G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; FAGUNDES, A.; BARROS, J. H. S.; DE PAULA, C. C.; TOMA, H. K.; MADEIRA, M. F. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology**, v.137, p.1653-1660, 2010.

PINTO, A.G.S; TOMA, H.K; FIGUEIREDO, F.B; MADEIRA, M.F. Evaluation of 18S rDNA PCR assay using skin fragments as a diagnostic test for *Trypanosoma caninum*, **Veterinary Parasitology**, v.205, p.343-346, 2014.

SANTANA, Vanessa Lira de. **Doença de Chagas em cães naturalmente infectados em região do semiárido nordestino**. Patos, PB, 2011. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande/PPGMV. 39p.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.257-261, 2011.

STUART, K.; BRUN, R; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, n.4, 2008.