

Resposta Imune humoral aos antígenos de *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* em cães de área endêmica para leishmaniose

Humoral immune response to Leishmania chagasi and Trypanosoma cruzi antigens in dogs from endemic areas for visceral leishmaniose

AGUIAR, Cristiane Silva^{1*}; ALCÂNTARA, Adriano Costa de¹; BITTENCOURT, Diana Velloso Viana¹; GOMES-NETO, Cyro de Moraes Barbosa¹; FRANKE, Carlos Roberto^{1,3}; AGUIAR, Paulo Henrique Palis^{1,3}; BARROUIN-MELO, Stella Maria^{1,2}

¹Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Laboratório de Infectologia Veterinária, Salvador, Bahia, Brasil.

²Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Salvador, Bahia, Brasil.

³Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Produção Animal, Salvador, Bahia, Brasil.

*Endereço para correspondência: aguiarcs@gmail.com

RESUMO

Objetivava-se com este trabalho verificar a presença de anticorpos contra *Trypanosoma cruzi* em cães de Barra do Pojuca (BA) e também avaliar a possível ocorrência de reação cruzada ou infecção mista com *Leishmania sp.* Foram testados 265 soros utilizando ELISA e 34 utilizando Western Blotting (WB). Entre os soros amostrados, 26 (9,8%) foram reagentes no ELISA para *T. cruzi* e desses, 12 (46,1%) foram também reagentes para *L. chagasi*, resultando em dupla positividade sorológica por essa técnica. Obteve-se no WB de *T. cruzi* 6 soros (17,6%) reagentes, apresentando 12 bandas protéicas, variando de 49 a 104 kDa, sendo 87 e 104 kDa as de maior frequência, observadas em 33,3% dos soros positivos. No WB de *L. chagasi*, 9 (26,5%) soros apresentaram 48 bandas variando de 7 a 181 kDa, sendo a de 83 kDa mais freqüente (55,5 % das amostras). De um total de 60 bandas visíveis, 7 (11,3%) são comuns aos dois agentes (entre 53 e 100 kDa), 6 (10 %) foram visualizadas somente no WB com antígeno de *T. cruzi* (entre 49 e 104 kDa) e as outras 47 (78,3 %) foram visualizadas somente no WB com *L. chagasi* (entre 7 e 181 kDa); 20 (58,8%) soros apresentaram divergência entre os resultados do ELISA e WB. O estudo aponta para o reconhecimento de anticorpos anti-*T.*

cruzi e anti-*L. chagasi* nas amostras de soro canino da área estudada, porém as técnicas de ELISA e WB, utilizando antígeno bruto, não foram suficientes para identificar com segurança infecções mista, e reações cruzadas.

Palavras-chave: antígeno bruto, doença de Chagas, peso molecular, ELISA

SUMMARY

In order to verify the presence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in dogs of Barra do Pojuca, Bahia, and assess the possible occurrence of cross-reactivity or infection with *Leishmania* mixed sp., we tested 265 sera using ELISA and 34 using Western Blot (WB). Among the 265 sera sampled 26 (9.8%) were in the ELISA reagents for *T. cruzi* and of those, 12 (46.1%) were also reagents to *L. chagasi*, resulting in double positive antibodies by this technique. Obtained in the WB of *T. cruzi* 6 sera (17.6%) reagents, featuring 12 protein bands ranging from 49 to 104 kDa, 87 and 104 kDa of the higher frequency, observed in 33.3% of positive sera. In the WB of *L. chagasi*, 9 (26.5%) sera had 48 bands visible, ranging from 7 to 181 kDa, with of 83 kDa of the higher frequency (55.5% of the samples). Of a total of

60 bands visible, 7 (11.3 %) are common to the two agents (between 53 and 100 kDa), 6 (10 %) were viewed only in WB with antigen of *T. cruzi* (between 49 and 104 kDa) and the other 47 (78.3 %) were viewed only in WB with *L. chagasi* (between 7 and 181 kDa). Our studies point to the recognition of anti-*T. Cruzi* and anti-*L. Chagasi* in samples of serum canine of the area studied, but the techniques the ELISA and WB using crude antigen was not enough to identify with certainty and mixed reactions cross infections.

Keywords: Chagas disease, gross antigen, *Leishmania sp.*, molecular weight

INTRODUÇÃO

Leishmania e *Trypanosoma* são gêneros de hemoflagelados que ocorrem de forma endêmica em regiões da América Central e do Sul (ROSYPAL et al., 2007). A Doença de Chagas (DC) é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, transmitido principalmente por insetos vetores que se mantêm na natureza parasitando grande quantidade de espécies de mamíferos, inclusive o homem (WHO, 2002). É considerada a quarta principal endemia no Continente Americano, onde se estima que o *T. cruzi* infecte de 16 a 20 milhões de pessoas (CAMACHO, 2003) e mais de quatro milhões de brasileiros encontram-se infectados numa área endêmica que se estende do Piauí ao Rio Grande do Sul (DIAS & VINHAES, 2000). *Leishmania chagasi* é o agente causador da leishmaniose visceral americana, transmitido aos mamíferos através da picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (DIAS et al., 2003).

Tanto *T. cruzi* quanto *L. chagasi*, têm sido detectados em uma ampla variedade de espécies de animais domésticos e selvagens incluindo cães, gatos, roedores e marsupiais. O cão é considerado o principal reservatório doméstico da infecção humana, por esses dois parasitos (ROSYPAL et al., 2007). O *T. cruzi* e o

L. chagasi são freqüentes nas áreas rurais (GOMES, 2007), mas os registros de ocorrência nas áreas urbanas são cada vez mais presentes (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006).

O diagnóstico da DC, sobretudo na fase crônica da infecção, depende do resultado de testes sorológicos. A utilização de dois ou mais testes sorológicos é necessária para diagnosticar com segurança a infecção chagásica (CERISOLA, 1969). A literatura descreve o uso de diferentes antígenos no teste sorológico ELISA para a DC; antígenos purificados (SCHECHTER et al., 1985), secretado-excretado (UMEZAWA et al, 2001) e recombinantes (UMEZAWA et al., 2003).

Objetiva-se com este trabalho analisar a presença de anticorpos contra *T. cruzi* em amostras de soro canino, com coletas realizadas na região de Barra de Pojuca (BA), utilizando as técnicas de ELISA e WB, e também avaliar a ocorrência de reação cruzada com *L. chagasi*, considerando a possibilidade de ambas as espécies ocorrerem na região.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo duzentas e sessenta e cinco (n=265) amostras de soro de cães, domiciliados no distrito de Barra do Pojuca no município de Camaçari (BA), as quais compunham a soroteca do Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Todas as amostras foram testadas por ELISA para *T. cruzi*, ELISA para *L. chagasi* e Western Blotting. O antígeno de *L. chagasi* utilizado no estudo foi caracterizado por eletroforese de isoenzimas e contra um painel de anticorpos monoclonais pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, Rio de

Janeiro. O antígeno de *T. cruzi* foi obtido da forma tripomastigota da cepa *Y* em cultura axênica em meio de infusão com triptose (meio LIT). Soros controles positivos e negativos foram incluídos nas análises.

Para o teste de ELISA foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno (96 poços, Corning Costar 3590, USA), sensibilizadas com 100µL (0,5µg/poço) dos antígenos de *L. chagasi* e *T. cruzi*, individualmente, em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH=9,6), por 16 horas, a 4°C (“Overnight”) e, após 3 lavagens com PBS-T (0,01M de tampão fosfato, pH=7,4; 0,15M de Cloreto de Sódio; e 0,05% de Tween 20), foram bloqueadas com PBS-T-M (PBS-T contendo 5% de leite desnatado) por uma hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS-T e incubadas por uma hora, a temperatura ambiente, com 100 µL dos soros diluídos 500 vezes em PBS-T-M, incluindo os soros caninos, controle positivos (pool de soros positivos) e controle negativos (pool de soros negativos), obtidos em área endêmica, avaliados por ELISA e xenodiagnóstico para *Leishmania sp.*, ou de animais controle ou naturalmente infectados por *T. cruzi*, cedidos pelo IOC, Fiocruz, Brasil. Foi utilizado como conjugado a proteína A com peroxidase na diluição de 1:8.000 (10-1023 ZYMED, INVITROGEN, USA), seguido de uma hora de incubação a temperatura ambiente. Posteriormente, o reconhecimento antigênico foi detectado com um tampão citrato-fosfato (0,2M de citrato e 0,1M de fosfato, pH=5,1), contendo 0,4 mg/ml de OPD (P9029, SIGMA, USA) e 0,03% de peróxido de hidrogênio, por 15 minutos. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Anthos 2010, Austria), com filtro de 492 nm e as densidades óticas (DO) registradas para posterior análise.

A eletroforese em gel descontínuo de

acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e os WB com os antígenos de *L. chagasi* e *T. cruzi* foi feita como descrito por Laemli (1970) e o manual “Protein Electrophoresis” da AMERSHAM BIOSCIENCES (GE, USA). A concentração do antígeno utilizada foi de 100 µg, para ambos os antígenos, e a concentração do gel de poli(acrilamida) utilizado foi de 10%. Utilizou-se o sistema semi-seco (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, SAN FRANCISCO, USA). A diluição do soro utilizado foi de 1:500 e a proteína A-peroxidase como conjugado (Zymed, Invitrogen, USA) na diluição de 1:1.000, revelado com 3-3’DiAminoBenzidina - DAB (SERVA ELECTROPHORESIS GmbH, Heidelberg, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 0,015%. Os soros foram classificados como negativos ou positivos, de acordo com Sánches et al. (2001), considerado-se positivo o soro que apresentou pelo menos uma banda igual ao do controle positivo utilizado no teste.

Utilizou-se o pacote estatístico SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) versão 12, para as análises estatísticas. A sensibilidade e a especificidade do teste ELISA foram estabelecidas utilizando-se a curva ROC (“Receiver Operating Characteristics”) e apresentaram 100% de sensibilidade e 90% especificidade. O cálculo dos PM das bandas encontradas foi realizado como descrito no manual “Protein Electrophoresis” da AMERSHAM BIOSCIENCES (GE, USA). A concordância entre os testes ELISA e WB foi avaliada pelo índice Kappa (intervalo de confiança de 95%), valores preditivos positivos (VPP) e valores preditivos negativos (VPN) foram estabelecidos. O intervalo de confiança adotado foi de 95% e os resultados foram considerados positivos com um $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame por ELISA das 265 amostras de soro canino, resultou em 26 (9,8%) soropositivos para *T. cruzi* e desses, 12 (46,1%) apresentaram-se também soropositivos para *L. chagasi*. Cinco (14,7%) amostras de soro apresentaram reação positiva tanto nos testes de ELISA e WB formulados com antígeno de *T. cruzi*, quanto nos formulados com antígeno de *L. chagasi*. Dentre elas, duas das cinco amostras de soro foram em

comum a banda 83 kDa no WB, para ambos os antígenos (Tabela 1).

Utilizando-se os resultados sorológicos no ELISA de 34 amostras (nove amostras positivas para *T. cruzi* e para *L. chagasi*, seis negativas para *T. cruzi* e positivas para *L. chagasi*, 11 positivas para *T. cruzi* e negativas para *L. chagasi*, oito negativas para ambos os antígenos), na avaliação da concordância entre os testes ELISA e WB para *T. cruzi* e para *L. chagasi*, obteve-se o valor do índice Kappa resultante de, respectivamente, de 0,15 e 0,57.

Tabela 1. Amostras de soro canino com reação positiva nos ELISAs para *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* e seus respectivos resultados no WB em kDa

Amostras	ELISA <i>T. cruzi</i>	ELISA <i>L. chagasi</i>	Bandas WB <i>T.</i> <i>cruzi</i>	Bandas WB <i>L. chagasi</i>	Bandas comuns
Q18C004	(+)	(+)	79 e 74	85, 83, 75, 69, 60, 64, 53, 48, 36-32, 29-25	Não
Q32C005	(+)	(+)	104, 91, 87, 58, 53, 49	100, 79-69, 63, 56, 52, 43, 39, 28-25, 22-18	Não
Q33C001	(+)	(+)	104, 87, 58	91-85, 79-69, 63, 56, 53- 49, 39, 37, 30, 26, 24-19, 16, 13, 11, 7	Não
Q47C001	(+)	(+)	100, 89, 83	177, 85, 83, 77, 72, 67, 57, 55, 50, 45, 33-23, 21, 11	83
Q65C003	(+)	(+)	100, 93, 83	181, 83, 77, 72, 50, 45, 33-29, 12	83

Os indicadores dos ELISAs referentes à sensibilidade 83,3 e 90%; à especificidade 46,4 e 75%; ao valor preditivo positivo (VPP) 25 e 60% e ao valor preditivo negativo (VPN) 93 e 95%, para os antígenos *T. cruzi* e *L. chagasi*, foram, respectivamente, calculados utilizando como referência os resultados mostrados no WB.

Das 34 amostras anteriormente citadas, 6 (17,6 %) apresentaram reação no WB com antígeno de *T. cruzi* e um total de

12 bandas foram visualizadas mostrando diferentes frequências e intensidades de reatividade, com bandas variando de 49 a 104 kDa (49, 53, 57, 58, 74, 79, 83, 87, 89, 91, 93, 100 e 104). Entre as bandas de maior frequência podemos citar a de 87 e 104 kDa, observadas em 50% das amostras positivas e as de 58, 83 e 100kDa presentes em 33,3% delas, as demais foram visualizadas em apenas uma das amostras (49, 53, 57, 79, 91 e 93).

As mesmas 34 amostras testadas com WB para *T. cruzi* foram testadas também em WB para *L. chagasi*, que resultou em 9 (26,5%) amostras reativas, apresentando um total de 48 bandas com diferentes frequências e intensidades de reatividade, variando de 7 a 181 kDa (7, 11, 12, 13, 16, 21, 22, 26, 30, 37, 39, 43, 45, 48, 50, 51, 52, 53,, 55, 56, 57, 63, 64, 67, 69, 72, 74, 74-67, 75, 77, 79, 83, 85, 97, 100, 102, 107, 177, 181, 18-22,19-24, 25-28, 23-33,29-33, 49-53, 69-79,85-91). Entre as bandas de maior frequência, podemos citar a de 83 kDa observada em 55,5% das amostras, as de 11, 25, 45, 50, 77, 85 e 100 kDa presentes em 33,3% das amostras, as de 26, 37, 39, 43, 56, 63, 67, 69, 72 kDa presentes em 22,2% das amostras, e as demais somente foram visualizadas em uma das amostras.

De um total de 60 bandas (12 de *T. cruzi* e 48 de *L. chagasi*) visualizadas neste estudo, 7 (11,3%) bandas foram observadas nos resultados do WB em ambos os antígenos, com pesos moleculares variáveis entre 53 a 100 kDa (53, 57, 74, 79, 83, 91, 100 kDa). Entre as 53 bandas restantes, 6 (10%) foram visualizadas somente no WB, utilizando o antígeno de *T. cruzi*, com os seguintes pesos moleculares 49, 58, 87, 89, 93 e 104 kDa, e as outras 47 (78,3%) foram visualizadas somente no WB para *L. chagasi*, com os seguintes pesos moleculares: 7, 11, 12, 13, 16, 21, 22, 26, 30, 37, 39, 43, 45, 48, 50, 51, 52, 55, 56, 60, 63, 64, 67, 69, 72, 75, 77, 85, 102, 107, 177, 181, 18-22, 19-24, 23-33, 25-28, 29-33, 32-36, 49-53, 67-74 e 69-79kDa.

Resultados divergentes foram observados em 20 (58,8%) das 34 amostras, em relação ao antígeno de *T. cruzi*, em que 13 (65,0%) amostras divergiram, sendo que 12 (92,3%) foram reagentes no ELISA e não apresentaram bandas visíveis no WB e 1 (7,7%)

apresentou resultado contrário. No teste com o antígeno de *L. chagasi*, 7 (35,0%) amostras divergiram, 6 (85,7%) foram soropositivas no ELISA e não apresentaram bandas visíveis no WB e 1 (14,3%) apresentou resultado contrário.

Anticorpos anti-*T. cruzi* foram observados em 9,8% (26/265) das amostras de soro canino analisadas neste estudo, semelhante ao resultado encontrado por Herrera et al. (2005), que utilizaram IFI e registraram 11% (6/52) de soropositividade em cães da periferia do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI). Houve considerável diferença no número de amostras de soros testadas entre os estudos. No estudo realizado pelos autores, foi testada por IFI a reatividade das mesmas amostras para *L. chagasi*, cujos dois soros positivos para *T. cruzi* apresentaram resultado positivo para *L. chagasi*, que correspondeu a 3,8% (2/52).

Rosypal et al. (2007) analisaram 365 soros caninos, 258 provenientes de Bogotá - Colômbia e 107 de São Paulo – Brasil, com IFI para *T. cruzi* e *L. chagasi*. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para *T. cruzi*, porém cinco soros do Brasil foram soropositivos para *L. chagasi*. Comparativamente aos resultados já descritos por esses autores, o número de soros com reação positiva no ELISA, foi elevado 12/26 (46,1%), e considerando 5/12 (40%) no WB, essas amostras confirmaram a reação positiva para ambos os antígenos. É possível que infecções mistas por *T. cruzi* e *L. chagasi* estejam ocorrendo, uma vez que o distrito de Barra do Pojuca (BA) é área endêmica para leishmaniose visceral (JULIÃO et al., 2007), mas dados epidemiológicos sobre DC no distrito não estavam disponíveis. No entanto, em decorrência das técnicas diagnósticas utilizadas neste estudo, não é possível descartar a ocorrência de reações

cruzadas, concordando com Herrera et al. (2005) em decorrência da semelhança filogenética entre estas duas espécies.

Sánchez et al. (2001), compararam os resultados de diagnósticos para *T. cruzi* e *L. chagasi* em ELISA e WB de 252 soros humanos oriundos da Cidade do México no México e do Rio de Janeiro no Brasil, e obtiveram um índice de concordância Kappa de 0,96, demonstrando boa afinidade entre ambos os testes.

Os valores de sensibilidade foram razoáveis em se tratando do uso do antígeno de *T. cruzi* (83,3%) e melhor com o uso do antígeno de *L. chagasi* (90%). A especificidade foi baixa em ambos os antígenos, já os valores de sensibilidade utilizando o antígeno de *T. cruzi* foi próximo ao obtido por Rosypal et al. (2007) de 89% para *T. cruzi* e 92% para *L. chagasi* utilizando IFI, embora as especificidades neste estudo, 46,4% para *T. cruzi* e 75% para *L. chagasi*, tenham sido superiores às encontradas pelos autores de 27% e 29%, respectivamente. Sánchez et al. (2001) registraram 100% de sensibilidade e 96% especificidade em ELISA, utilizando antígeno bruto de *T. cruzi* em soros de pacientes humanos, valores muito acima dos encontrados no presente estudo. Essa divergência entre os resultados de sensibilidade e especificidade pode ser associada com a perda de reconhecimento antigênico de amostras de soros conservadas em freezer por longo tempo.

Camargo (1992) verificou que a sensibilidade dos testes sorodiagnóstico para DC aumenta com a utilização de antígenos recombinantes complementares, visto que numerosos polipeptídeos do *T. cruzi* podem ser usados de forma isolada ou em combinação, especialmente em testes confirmatórios dos resultados obtidos em exames de triagem de pacientes.

Um grande número de antígenos de *T.*

cruzi (Cepa Y), com aparente peso molecular variando de 49 a 104 kDa, foi reconhecido pelos soros caninos testados neste trabalho. Segundo Stolf (1992) os estudos apontam divergências sobre o principal antígeno de *T. cruzi*, sobre a elevada complexidade antigênica desta espécie e as limitações intrínsecas dos métodos de análise geralmente empregados no estudo da DC.

Semelhanças antigênicas estão bem documentadas entre esses microrganismos e podem confundir o diagnóstico (MALCHIODI et al., 1994). Neste estudo, observou-se que sete bandas foram comuns aos dois antígenos, as quais sugerem a presença de epítomos comuns e a ocorrência de uma provável reação cruzada ou infecção mista, já relatada na literatura por Nabity et al. (2006), por meio de análise imunohistoquímica de material colhido de um cão da raça Mastiff Inglês no Texas.

Malchiodi et al. (1994) encontraram bandas com pesos moleculares correspondentes a 48, 56, 73, 140 e 155 kDa, que só foram reconhecidas pelo soro de pacientes acometidos de leishmaniose e não foram reconhecidos por soros de pacientes chagásicos, em que estão de acordo com o este estudo somente a banda de 48 kDa. As demais não foram reconhecidas ou foram comuns aos dois antígenos, além de 26,6% dos pacientes acometidos de leishmaniose exibirem padrão de reatividade semelhante ao de pacientes chagásicos, quando testados com antígeno de epimastigota de *T. cruzi*, reconhecendo as bandas de 43, 45-51, 111, 116, 125 e 131 kDa.

A banda 83 kDa foi observada com frequência no WB dos dois antígenos, não servindo como uma das bandas indicadoras de infecção por *T. cruzi*, segundo Sánchez et al. (2001). As bandas de 87 e 104 kDa foram as de

maior frequência no WB de *T. cruzi* e estavam ausentes no WB de *L. chagasi*. As bandas de 11, 45, 50, 77, 85 kDa foram as de maior frequência no WB de *L. chagasi* e ausentes no WB de *T. cruzi*, porém não foi observada nenhuma banda que pudesse ser utilizada como antígeno específico para um ou outro microorganismo, comparando com os resultados de ELISA.

O estudo aponta para o reconhecimento de anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-*L. chagasi* nas amostras de soro canino da área estudada, sugerindo o envolvimento do cão, também na epidemiologia da DC no distrito de Barra do Pojuca (BA), porém a utilização da técnica de ELISA e WB com antígeno bruto, não foi suficiente para identificar com segurança infecções mistas e reações cruzadas. Em vista da importância de ambas as zoonoses para a saúde pública, novos estudos são ainda necessários para elucidar o possível envolvimento do cão na epidemiologia da DC na região, definir medidas sanitárias adequadas ao controle e monitoramento, além de elucidar a natureza dessas moléculas que são comuns aos dois antígenos.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Heitor Miraglia Herrera (IOC) pelos soros caninos controle positivo e negativo de T. cruzi; Ricardo Ribeiro dos Santos, Milena Botelho e Ricardinho (CpqGM-FIOCRUZ/BA) e a FAPESB.

REFERÊNCIAS

CAMACHO, A.A. **Cardiomiopatia chagásica em cães**. In: BELERENIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais. São Paulo: Interbook, 2003. p.162-165.[Links].

CAMARGO, M.E. Serological diagnosis: an appraisal of Chagas' disease serodiagnosis. Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A, eds. *Chagas' disease (American Trypanosomiasis); Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: **International Society of Blood Transfusion**, p. 165–178, 1992. [Links].

CERISOLA, J.A. Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.24, p.54, 1969. [Links].

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÉLO, J.M.M. Fonte alimentar alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003. [Links].

DIAS, J.C.P; VINHAES, M.C. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, 2000. Supl. 2. [Links].

GOMES, A.H.; FERREIRA, I.M.; LIMA, M.L.; CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.; ARAÚJO, M.F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.234–241, 2007. [Links].

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

JULIÃO, F.S.; SOUZA, B.M.P.S.; FREITAS, D.S.; OLIVEIRA, L.S.; LARANJEIRAS, D.F.; DIAS-LIMA, A.G.; SOUZA, V.M.M.; BARROUIN-MELO, S.M.; MOREIRA JR, E.D.; PAULE, B.J.A.; FRANKE, C.R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.8, p.319-324, 2007. [Links].

LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970. [Links].

MALCHIODI, E.L.; CHIARAMONTE, M.G.; TARANTO, N.J.; ZWIRNER, N.W.; MARGINI, R.A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clinical & Experimental Immunology**, v.97, p.417-423, 1994. [Links].

MOMCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.100, p.663-677, 2006. [Links].

NABITY, M.B.; BARNHART, K.; LOGAN, K.S.; SANTOS, R.L.; KESSEL, A.; MELMED, C.; SNOWDEN, K.F. An atypical case of *Trypanosoma cruzi* infection in a young English Mastiff. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.356-361, 2006. [Links].

ROSYPAL, A.C.; CORTÉS-VECINO, J. A, GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; TIDWELL, R. R.; LINDSAY, D. S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.172-177, 2007. [Links].

SÁNCHEZ, B.; MONTEÓN, V.; REYES, P.A.; ESPINOZA, B. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies Using Extracts from Mexican Strains as Antigens. **Archives of Medical Research**, v.32, p.382-388, 2001. [Links].

SCHECHTER, M.; LUQUETTI, A.O.; REZENDE, J.M.; RASSI, A.; MILES, M.A. Further evaluation of lectin affinity purified glycoprotein (GP90) in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.637-640, 1985. [Links].

STOLF, A.M.S. *Trypanosoma cruzi* antigens in serodiagnosis. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. (Eds.). **Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT 92, 1992. p.195-205. [Links].

UMEZAWA, E.S.; BASTOS, S.F.;
COURA, J.R.; LEVIN, M.J.;
GONZALEZ, A.; RANGEL-ALDAO,
R.; ZINGALES, B.; LUQUETTI, A.O.;
SILVEIRA, J.F. An improved
serodiagnostic test for Chagas' disease
employing a mixture of *Trypanosoma
cruzi* recombinant antigens.
Transfusion, v.43, n.1, p. 91-97, 2003.
[Links].

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO,
M.S.; STOLF, A.M.S. Enzyme-linked
immunosorbent assay with
Trypanosoma cruzi excreted-secreted
antigens (TESA-ELISA) for
serodiagnosis of acute and chronic
Chagas' disease. **Diagnostic
Microbiology Infectious Disease**, v.39,
n.3, p.169-176, 2001. [Links].

WORLD HEALTH ORGANIZATION
– WHO. **Report of the expert
committee on the control of Chagas
disease, technical report series.**
Geneva, 2002. 85p. [Links].

Data de recebimento: 27/08/2008
Data de aprovação: 07/04/2009