

DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM CANINOS E FELINOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Anna Clara Paulino de Queiroz

Universidade Federal de Campina Grande. Centro
de Saúde e Tecnologia Rural. UFCG-CSTR
annclaraqueiroz@gmail.com

Tassia Laicya Vieira de Souza

Universidade Federal de Campina Grande. Centro
de Saúde e Tecnologia Rural. UFCG-CSTR
tassialaicya@gmail.com

Marcia Almeida de Melo

Universidade Federal de Campina Grande. Centro
de Saúde e Tecnologia Rural. UFCG-CSTR
marcia.melo@ufcg.edu.br

RESUMO

A Doença de Chagas é uma parasitose negligenciada causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário com ciclo de vida que inclui caninos e felinos como hospedeiros. Dentre as técnicas de diagnóstico da infecção, a qPCR é vista como um método de grande sensibilidade e de boa quantificação. Diante disso, esta revisão teve o objetivo de analisar as diferentes estratégias de utilização da qPCR, voltadas para o diagnóstico de *T. cruzi* em caninos e felinos, e os possíveis avanços na padronização da técnica. A pesquisa foi conduzida segundo diretrizes do PRISMA, e através de dois termos de busca, foram selecionados artigos indexados nas bases de dados: Embase, Scopus e PubMed. Mediante um gerenciador de referências, 2.411 artigos foram selecionados e, seguindo critérios de elegibilidade pré-estabelecidos, sete foram incluídos para extração de dados. Os estudos se caracterizaram por obtenção de DNA a partir de sangue total, e extraído com kits comerciais. Primers distintos foram utilizados para a identificação de animais positivos, e para a caracterização da DTU, os principais marcadores moleculares foram DNA satélite e região intergênica spliced-leader do gene do mini-exon (SL-IR). O diagnóstico apresentou grande avanço, sendo a qPCR duplex ou multiplex indicadas para a identificação de DTUs de *T. cruzi*.

Palavras-chave: qPCR. Cães. Gatos. Tripanossomíase Americana. Parasitologia.

MOLECULAR DIAGNOSIS FOR DETECTION OF *Trypanosoma cruzi* IN CANINES AND FELINES: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan with a life cycle that includes canines and felines as hosts. Among the infection diagnosis techniques, qPCR is seen as a method of great sensitivity and good quantification. Therefore, this review aimed to analyze the different strategies for using qPCR, aimed at diagnosing *T. cruzi* in canines and felines, and possible advances in the standardization of the technique.

The research was conducted according to PRISMA guidelines, and using two search terms, articles indexed in the databases were selected: Embase, Scopus and PubMed. Using a reference manager, 2.411 articles were selected and, following pre-established eligibility criteria, seven were included for data extraction. The studies were characterized by obtaining DNA from whole blood, and extracted with commercial kits. Different primers were used to identify positive animals, and for the characterization of DTU, the main molecular markers were satellite DNA and the spliced-leader intergenic region of the mini-exon gene (SL-IR). The diagnosis has made great progress, with duplex or multiplex qPCR being indicated for the identification of *T. cruzi* DTUs.

Keywords: qPCR, Dogs. Cats. American trypanosomiasis. Parasitology.

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença parasitária potencialmente fatal, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e transmitida por insetos hemípteros da subfamília Triatominae. Essa zoonose é endêmica em 21 países da América Latina, e está presente em países como Estados Unidos, Canadá, Suíça, Espanha, França, Itália, Japão, países da Ásia e da Oceania (WHO, 2023; WHO, 2020).

O protozoário *T. cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) é um hemoflagelado, que possui um complexo ciclo de vida do qual fazem parte hospedeiros vertebrados e invertebrados (VELASCO; MORILLO, 2020). O parasito pode ser transmitido por mais de 100 espécies de triatomíneos e possui mais de 70 hospedeiros mamíferos que participam do ciclo de transmissão (ZINGALES, 2018).

A ocorrência da doença se dá em três ciclos: o silvestre, no qual diversas espécies de

selvagens albergam o parasito, o peridoméstico e o doméstico, com destaque para a infecção em cães, gatos e humanos (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2019). A origem da sua heterogeneidade ainda representa um desafio a ser compreendido (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018), embora a multiplicação do *T. cruzi* seja, principalmente, clonal, eventos de hibridização e introgressão mitocondrial ocorrem tanto intra como inter- DTUs (Unidades Discretas de Tipagem - *Discrete Typing Units*) (TOMASINI, 2018).

Animais domésticos, como cães e gatos, são elos importantes entre diferentes ambientes. Os cães são uma fonte comum de sangue para os triatomíneos e desempenham um papel crucial como hospedeiros e reservatórios domésticos de *T. cruzi* em diversas regiões das Américas (CARDINAL *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021). A detecção de *T. cruzi* em gatos também já foi relatada (ZECCA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*,

2021; DUMONTEIL *et al.*, 2021), mas a epidemiologia, a consequência da infecção nesses animais e o grau de risco desses, em relação a humanos, ainda são desconhecidos (ZECCA *et al.*, 2020).

Para o diagnóstico da infecção, a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) é um método sensível, de grande especificidade e, comumente, utilizado para detecção, identificação, quantificação e genotipagem de microrganismos (HARSHITHA; ARUNRAJ, 2021). Em virtude da utilização da técnica no diagnóstico da Doença de Chagas, esta revisão tem o objetivo de analisar as diferentes estratégias de qPCR voltadas para o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* em caninos e felinos, além dos possíveis avanços de padronização da técnica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo consiste em uma revisão sistemática de literatura, com síntese de dados qualitativos disponíveis em estudos de diagnóstico indexados mundialmente, conduzida de acordo com as diretrizes do PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Análises*) (PAGE *et al.*, 2021). O uso de métodos sistematizados, através do fornecimento de dados confiáveis facilita a obtenção de conclusões mais precisas (LASSERSON *et al.*, 2021).

2.1 Estratégia de Busca

A pesquisa foi pautada através do seguinte questionamento: “Como a técnica de qPCR tem sido utilizada para detectar infecção por *T. cruzi* em animais de estimação? ”, e na estratégia de busca PICO (*Population, Intervention, Comparison,*

Outcome), recomendada para revisões sistemáticas (AMIR-BEHGHADAMI *et al.*, 2020).

A pesquisa online foi realizada através da plataforma de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com a acesso à Biblioteca Virtual em Saúde. Foram selecionados artigos indexados nas bases de dados: Embase, Scopus e PubMed. Operadores booleanos foram usados para cruzar descritores e palavras-chave, formando os seguintes termos de busca: “chagas disease OR dog AND qPCR”, e “chagas disease OR cat AND qPCR”.

2.2 Elegibilidade

Os critérios de inclusão para seleção consistiram em: (I) artigos indexados em uma das três bases de dados selecionadas; (II) estudos originais publicados em português, inglês ou espanhol; (III) publicados entre 2018 e 2023; (IV) diagnóstico de *T. cruzi* em cães; (V) diagnóstico de *T. cruzi* em gatos; (VI) detecção de *T. cruzi* pelo método de qPCR. Foram excluídos da pesquisa revisões de literatura, editoriais, trabalhos de dissertação ou tese, artigos que relatassem sobre tratamento, com ausência de diagnóstico por qPCR, e que não realizassem estudos em cães e/ou gatos. Os artigos resultantes da pesquisa foram filtrados e extraídos para um gerenciador de referências.

2.3 Risco de Viés

Seguindo as recomendações do PRISMA-P, a qualidade dos métodos utilizados e as análises do risco de viés do estudo foram realizadas (STEWART *et al.*, 2015). A avaliação e classificação dos estudos foi realizada por dois

revisores, sendo verificadas as informações essenciais na descrição do método utilizado, evitando qualquer viés potencial ou conflito de interesses, e mascarando os nomes dos autores e revistas.

2.4 Seleção e extração de dados

Através do uso do gerenciador foram excluídos artigos duplicados, seguida da primeira seleção por análise do título e do resumo posterior leitura do texto completo de cada estudo. Durante a seleção, foram excluídos os artigos que também não atendessem aos critérios de elegibilidade pré-estabelecidos.

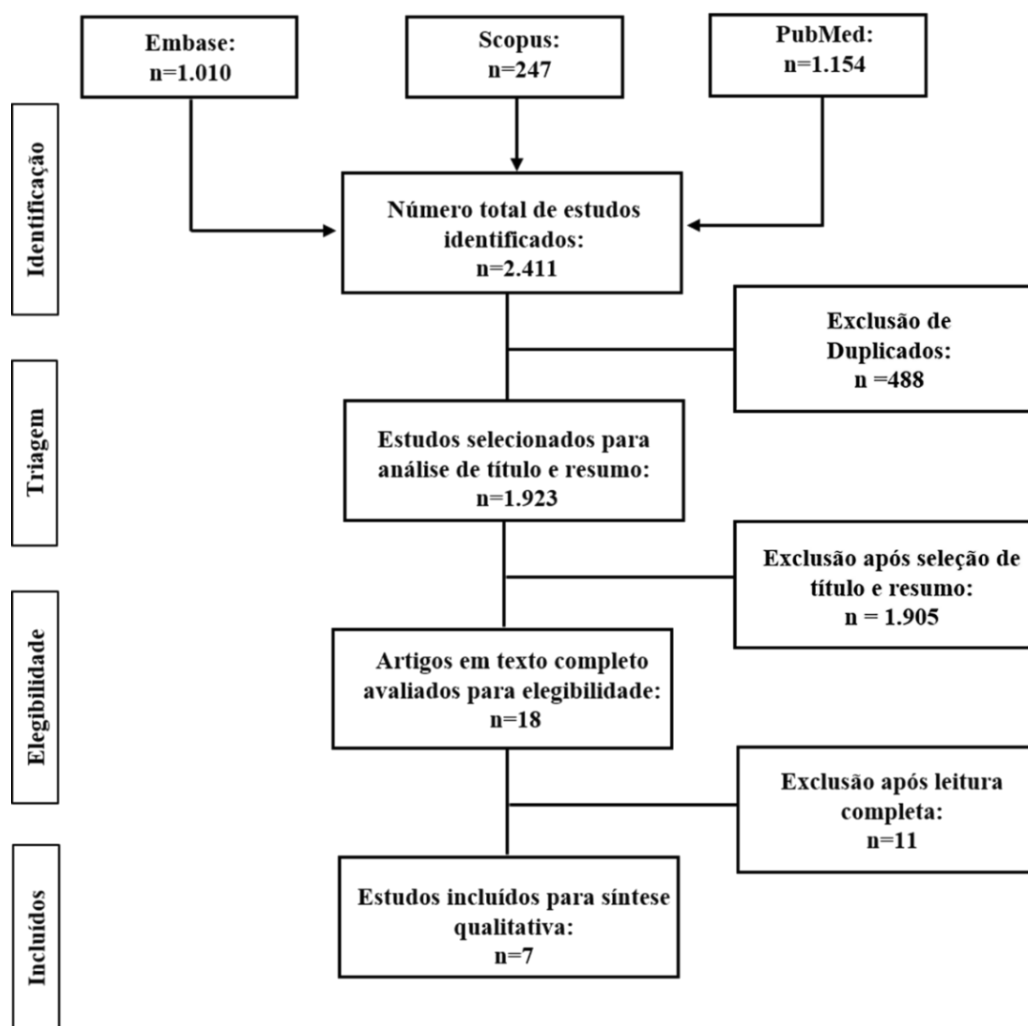
Uma síntese qualitativa foi feita com base nos critérios de inclusão e exclusão e os estudos

foram selecionados por dois examinadores, sendo extraídos os seguintes dados de cada estudo: nome do autor e ano de publicação, país, organismo, amostra biológica, técnicas de diagnóstico aplicadas, método de extração, sequências de oligonucleotídeos, e sondas utilizadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca nas três bases de dados resultou, inicialmente, em um total de 2.411 estudos, com 488 duplicados, que foram removidos. Após a leitura do título e resumo, 1.905 artigos foram rejeitados por estarem entre os critérios de exclusão, restando 18 estudos, que foram lidos completamente e sete preencheram os critérios de inclusão, que foram utilizados para a revisão sistemática. O processo completo de busca, screening e seleção está demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma de seleção de estudos para revisão sistemática, baseado no protocolo PRISMA.



Fonte: Os autores

Todos os estudos incluídos foram escritos em inglês e, em sua maioria, realizados no sul dos Estados Unidos, porém nem todos foram produzidos em áreas endêmicas para a DC. Os estudos tinham como objetivo geral a determinação da prevalência da infecção em cães (HODO *et al.*, 2018; TAHIR *et al.*, 2018., CHAN-PÉREZ *et al.*, 2022; ZECCA *et al.*, 2019) e/ou desenvolvimento de ensaios usando novas abordagens de biologia molecular, para a detecção e quantificação do parasito (JIMÉNEZ-COELLO *et al.*, 2018; WEHRENDT *et al.*, 2019; CURTIS-ROBLES *et al.*, 2018; ZECCA *et al.*, 2019). Foram encontradas diferenças com relação ao desenho do estudo,

amostra coletada, preparação das amostras, marcadores moleculares selecionados, os sistemas de detecção, entre outros.

Cinco estudos foram voltados para o diagnóstico em cães, um com foco em cães e gatos, e um apenas em gatos. Outros cinco estudos (71,42%) compararam os resultados da qPCR com métodos sorológicos e parasitológicos e três (28,48%) estudos avaliaram a prevalência da infecção e/ou apenas a detecção/quantificação do *T. cruzi* pela qPCR, a caracterização dos estudos está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Estudos selecionados para a síntese qualitativa.

Autor/ Ano	País	Animais estudados	Amostra Biológica	Técnicas de diagnóstico
CURTIS-ROBLES <i>et al.</i> (2018)	Texas (EUA)	Cão	Tecido	Biópsia do Tecido linfonodal; qPCR; PCR
HODO <i>et al.</i> (2018)	Texas	Cães	Sangue Coágulo	Stat-Pak; CDP; qPCR
JIMÉNEZ-COELLO <i>et al.</i> (2018)	México	Cães	Sangue	ELISA; WB; qPCR
TAHIR <i>et al.</i> (2018)	Guiana Francesa	Cães	Sangue	DPP; qPCR
WEHRENDT <i>et al.</i> (2019)	Argentina, Colômbia, México	Cães, Gatos, silvestres.	Sangue	qPCR
ZECCA <i>et al.</i> (2019)	Texas	Gatos	Sangue e tecido	Stat-Pak; DPP; IFAT; qPCR; PCR
CHAN-PÉREZ <i>et al.</i> (2022)	México	Cães e humanos	Sangue	ELISA; WB; qPCR

O DNA do parasito foi pesquisado, principalmente, em sangue total ou coágulo (HODO *et al.*, 2018), mas também em amostras como linfonodo, cérebro, coração, língua, intestino, rim, traqueia, útero, glândula mamária, leite, testículo e ovário (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2018; ZECCA *et al.*, 2019). Em todos os artigos, foram utilizados kits comerciais para purificação do DNA genômico. WEHRENDT *et al.* (2019) indicam que o DNA foi obtido através de kits comerciais e pelo protocolo padrão de fenol clorofórmio. Apesar da maioria dos estudos ter usado kits comerciais para extração do DNA, houve grande variação quanto à quantidade inicial de material biológico utilizado. Quando o sangue era usado, a quantidade variou de 100µl a 3ml. Dois estudos informaram o volume total da reação sem especificar o volume usado para extração de DNA (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2018; ZECCA *et al.*, 2019). Apenas um estudo não informou a quantidade de sangue utilizada para a extração do DNA (CHAN-PÉREZ *et al.*, 2022). O sangue foi

coletado e preservado em EDTA (TAHIR *et al.*, 2018), em guanidina e EDTA (WEHRENDT *et al.*, 2019;) e em PAX gene (cat no.761125; BD-Quiagen) (JIMÉNEZ-COELLO *et al.*, 2018); três não utilizaram anticoagulante (HODO *et al.*, 2018; ZECCA *et al.*, 2019; CHAN-PÉREZ *et al.*, 2022).

Em relação à metodologia da qPCR, diferenças foram observadas quanto à técnica de extração do DNA, ao uso de sondas (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2018; TAHIR *et al.*, 2018) ou sistema SYBR green (JIMÉNEZ-COELLO *et al.*, 2018; CHAN-PÉREZ *et al.*, 2022) e ao marcador molecular amplificado. A presença de inibidores foi avaliada pela amplificação dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH gene) e da proteína transportadora de retinol (IRBP - *Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein*). A verificação da presença do parasito nos tecidos estudados foi realizada pela amplificação da sequência da região intergênica spliced-leader, para identificação da DTU, ou para regiões repetidas de DNA satélite, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Métodos de extração, sequência de oligonucleotídeos e sondas utilizada na qPCR dos artigos selecionados para síntese qualitativa.

Autor/ Ano	Método de extração	Sequências de oligonucleotídeos	Sondas
CURTIS-ROBLES <i>et al.</i> (2018)	Kit de extração de DNA comercial (kit Biostic FFPE Tissue DNA Isolation, Mo Bio, Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA)	Sequências múltiplas, de acordo com protocolo descrito por Cura <i>et al.</i> (2015)	Sondas TaqMan (Integrated DNA Technologies, Inc. EUA).
HODO <i>et al.</i> (2018)	Kit comercial baseado em spin-column (kit E.Z.N.A. Tissue DNA; OmegaBio-Tek, Norcross, Geórgia)	Fw (5'-AST CGG CTG ATC GTT TTC GA-3') Rev (5'-AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA-3')	FAM. (5'-CAC ACA CTG GAC ACC A-3')
JIMENEZ-COELLO <i>et al.</i> (2018)	Kit comercial baseado em spin-column (kit E.Z.N.A. Tissue DNA; OmegaBio-Tek, Norcross, Geórgia)	PCR quantitativa: TCZ-F (5'-GAT CTT GCC CAC AMG GGT GC-3'); TCZ-R (5'-CAA AGC AGC GGA TAG TTC AGG-3') Reação de RPA e leitura LF: Fw (5'-GCT GCA CTC GGC GGA TCG TTT TCG AG-3'); Rev (5'-GTT TGG TGT CCA GTG TGT GAA CAC GCA AAC A-3')	PCR quantitativa: SYBR-Green (172-5271; Bio-Rad) RPA-LF: FAM. (5'-GCA CCA CAC GTT GTG GTC TAA ATT TTT GTT TCG AAT TAT GAA TGG-3')
TAHIR <i>et al.</i> (2018)	Kit comercial EZ1 DNA Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Alemanha).	Fw (5'-TTT GGG AGG GGC GTT CA 3'). Ver (5'-ATA TTA CAC CAA CCC CAA TCG AA-3') (Qvarnstrom <i>et al.</i> , 2012)	TaqMan de kDNA. (5'-CAT CTC(A/C) CCC GTA CAT T-3')
WEHREND T <i>et al.</i> (2019)	Fenol clorofórmio e Kit de preparação modelo PCR de alta pureza (Roche Diagnostic Corp., Indiana, EUA)	Fw (5'-TGA ATG GYG GGA GTC AGA G 3') Rev (5'-ATT CCT CCA AGM AGC GGA T-3') Primer IRBP2 Fw: (5'-CCA AYA CVA CCA CTG AGA TCT G-3') Primer IRBP3 Rev: (5'-GCG CAT CTG YTT GAG GAT GTA RG-3')	FAM-5'-CAC ACA CTG GAC ACC AA-NFQ-MGB-3' Sonda IRBP: (5'-HEX-TGG TGG TCC TCA CCA G-NFQ-MGB-3')
ZECCA <i>et al.</i> (2019)	Kit de DNA de tecido (Ômega Bio-Tek, Norcross, GA)	SatDNA de <i>T. cruzi</i> : Fw (5'-AST CGG CTG ATC GTT TTC GA-3') Rev (5'-AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA-3') (Duffy <i>et al.</i> , 2013) SL-IR: (Cura <i>et al.</i> , 2015)	FAM (5'-CAC ACA CTG GAC ACC AA-NFQ-MGB-39-3') (Duffy <i>et al.</i> , 2013) SL-IR: (Cura <i>et al.</i> , 2015)

CHAN-PÉREZ <i>et al.</i> (2022)	Kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen).	TCZ-F (5'-GCT CTT GCC CAC AMG GGT GC-3') TCZ-R (5'-CCAAGCGGATAG TTC AGG-3')	SYBR-Green PCR (Qiagen)
---------------------------------	--	--	-------------------------

Fw: Forward; Rv: Reverse

Não houve grandes riscos de vieses, mas as características voltadas à população estudada variaram consideravelmente, com algumas informações não fornecidas por alguns autores, como: a área geográfica do local estudado, densidade demográfica, espécie, origem, e idade dos animais analisados. A densidade demográfica foi a informação mais comumente omitida.

A análise completa dos artigos permitiu verificar que a combinação de técnicas sorológicas para detectar infecções crônicas e aplicação de qPCR para casos de fase aguda é vista como boa alternativa de detecção, permitindo avanços na qualidade dos estudos epidemiológicos em diferentes espécies (CHAN-PÉREZ *et al.*, 2022). Porém, segundo Wehrendt *et al.* (2019), com a ocorrência da baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos convencionais, abordagens moleculares são necessárias para preencher essa lacuna, sendo necessária adequação da coleta e do processamento da amostra, bem como o desenvolvimento e padronização da técnica.

Dentre as estratégias de padronização, foi avaliada a viabilidade de um ensaio duplex com amplificação conjunta do DNA satélite de *T. cruzi* e do gene IRBP (SatDNA/IRBP) para verificar a presença de inibidores na reação (WEHRENDT *et al.*, 2019). Ensaio multiplex tem sido proposto para determinar as DTUs de *T. cruzi*, tendo como base a amplificação da região intergênica spliced-leader

do gene do mini-exon (SL-IR) (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2018).

Estudos realizados por Wehrendt *et al.* (2019) demonstraram que o ensaio duplex SatDNA/IRBP é eficaz para a detecção de *T. cruzi* e triagem de infecção em amostras de diferentes mamíferos, como cães e gatos. O ensaio é feito a partir da amplificação simultânea de um alvo específico de DNA de *T. cruzi*, e a incorporação da amplificação do gene que codifica a proteína interfotorreceptora de ligação ao retinóide (IRBP). O uso dos genes que codificam para a GAPDH e a IRBP como controles endógenos para amostras das espécies *Canis familiaris* e *Felis catus* permitem a identificação de PCR falso negativo devido à presença de inibidores da PCR e/ou pela degradação do DNA, inferindo positivamente na qualidade da amostra e na segurança do resultado (Wehrendt *et al.*, 2019).

O gene gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é visto como boa alternativa, quando amplificado antes do uso de uma amostra de DNA (CHAN-PÉREZ *et al.*, 2022). Segundo Jiménez-Coello *et al.* (2019), a avaliação das amostras por qPCR para esse gene ajuda detectar a presença potencial de inibidores na mistura de reação e usar quantidades iguais de DNA em todas as reações.

A identificação de DTU em diferentes amostras pode ser realizada após extração simples do DNA e pela técnica de qPCR, sendo o sangue o

tecido adequado nas infecções agudas (CURTIS-ROBLES *et al.*, 2018).

Hodo *et al.* (2018) realizaram, em uma primeira etapa, uma PCR quantitativa com amplificação da região 166pb de uma sequência repetitiva de DNA satélite. Na segunda etapa, para amostras positivas suspeitas, a amplificação da região intergênica spliced-leader do gene do mini-exon (SL-IR) por qPCR multiplex para identificação da DTU.

Já em teste com gatos domésticos e considerando amostras obtidas de coágulo de sangue e tecidos, conforme Zecca *et al.* (2019) até três qPCRs independentes podem ser utilizadas: uma qPCR de triagem para amplificar um segmento de 166 pb do DNA satélite repetitivo de 195 pb do *T. cruzi*, e um multiplex qPCR amplificando a região intergênica spliced-leader (SL-IR) para confirmar a positividade e determinar *T. cruzi* DTU. Em caso das amostras apresentarem resultado negativo no ensaio SL-IR, e positivo no ensaio inicial, são submetidas a uma PCR convencional do DNA cinetoplasto, utilizando novos pares de primers de *T. cruzi*, considerando

positivas apenas amostras com reatividade em dois ensaios independentes.

Com o objetivo de determinar a *T. cruzi* DTU em amostras de DNA extraída de tecidos de cão, o ensaio feito por Curtis-Robles *et al.* (2018), visou a amplificação da região intergênica spliced-leader (SL-IR), com auxílio de painel de sondas específicas da DTU. E para discernir potenciais picos de nucleotídeos duplos e designar a DTU, foi determinada a qualidade Jiménez-Coello *et al.* (2019) tornaram possível a identificação de animais positivos para as DTUs I–VI de *T. cruzi* utilizando um dipstick composto por uma reação de qPCR a partir de amostras de sangue de cães. O teste apresentou uma sensibilidade de 93,2% e uma excelente concordância com ensaios sorológicos, indicando-o como uma ferramenta alternativa em estudos epidemiológicos sobre os ciclos silvestre e urbano de *T. cruzi* na América Latina.

O cão, e em menor escala o gato, são animais sentinelas para a infecção por *T. cruzi* no ciclo doméstico, principalmente, onde a doença de Chagas é endêmica (TAHIR *et al.*, 2018), sendo útil para guiar as medidas de vigilância em saúde (HODO *et al.*, 2018).

parasito no ciclo peridoméstico, ainda há carência de pesquisas acerca do último papel epidemiológico do gato.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qPCR representa grande avanço no auxílio diagnóstico, facilitando sobremaneira a quantificação da expressão gênica, a partir de amostras biológicas de diversos tecidos e microrganismos, sendo a qPCR duplex ou multiplex indicadas para a identificação de DTUs de *T. cruzi* em caninos e felinos.

Apesar da importância do cão e do gato como animais sentinelas para a presença do

REFERÊNCIAS

AMIR-BEHGHADAMI, M.; JANATI, A. Population, Intervention, Comparison, Outcomes and Study (PICOS) design as a framework to formulate eligibility criteria in systematic reviews. **Emergency Medicine Journal**, v. 36, n.6, p.1, 2020.

- CARDEAL, M. V.; ENRIQUEZ F.B.; MACCHIAVERNA, N. P.; ARGIBAY H.D.; FERNANDEZ N.D.P.; ALVEDRO, A.; GASPE, M.S.; GUTLER, R.E. Impacto a longo prazo de um programa de intervenção de dez anos na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* humano e canino no Chaco argentino. **PLoS negligenciadas doenças tropicais**, v. 15, n. 5, p. 1-23, 2021.
- CHAN-PÉREZ, J. I.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; ORTEGA-PACHECO, A. HERNÁNDEZ-CORTAZAR, I.B.; CIGARROA-TOLEDO, N.; JIMÉNEZ-COELLO, M. Combined use of real-time PCR and serological techniques for better surveillance of chronic and acute American trypanosomiasis in dogs and their owners in an endemic rural area of neotropical Mexico. Current research in parasitology and vector-borne. **Current Research in Parasitology & Vector-borne Diseases**, v. 2, p. 1-6, 2022.
- CURTIS-ROBLES, R.; AUCLAND L.D.; HODO C.L.; SNOWDEN K.F.; NABITY M.B.; HAMER A.S. *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit TcIV implicated in a case of acute disseminated canine Chagas disease. **Vet Parasitol Reg Stud Reports**. v. 12, p.85-88, 2018.
- CURA, C. I.; DUFFY, T.; LUCERO, R.H.; BISIO, M.; PÉNEAU, J.; JIMENEZ-COELLO, M. , CALABUIG, E.; GIMENEZ, M.J.; AYALA, E.V. KJOS, S.A., SANTALLA, J. MAHANEY, S.M.; CAYO, N.M.; NAGEL.C.; BARCÁN, L.; MACHACA, E.S.M.; VIANA, K.Y.A; BRUTUS, L.; OCAMPO, S.B.; AZNAR, C.; CUBA CUBA, C.A. GÜRTLER, R.E.; RAMSEY, J.M; RIBEIRO, I.; VANDEBERG, J.L.; YADON, Z.E.; OSUNA, A.; SCHIJMAN, A.G. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.5, p.1-18, 2015.
- DUFF, T. CURA, C.I.; RAMIREZ J.C; ABATE, T.; CAYO, N.M; PARRADO, R.; BELO, Z.D.; VELAZQUEZ, E.; MUÑOZ-CALDERON, A.; JUIZ, N.A.; BASILE, J.; GARCIA, L.; RIARTE, A.; NASSER, J.R.; OCAMPO S.B.; YADON, Z.E.; TORRICO, F.; NOYA, B.A. RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A.G. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.1, p.1-11, 2013
- DUMONTEIL, E.; DESALE, H. Shelter cats host infections with multiple *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in southern Louisiana. **Veterinary Research**, v. 52, n.53, p. 1-8, 2021.
- HARSHITHA, R. ARUNRAJ, D. R.PCR quantitativo em tempo real: uma ferramenta para quantificação absoluta e relativa. **Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular**, p.1-13, 2021
- HODO, C. L.; RODRIGUEZ J.Y.; CUTIS-ROBLES, R.; ZECCA, I.B.; SNOWDEM, K.F.; CUMMINGS, K.J.; HAMER, S.A. Estudo transversal repetido de *Trypanosoma cruzi* em cães de abrigo no Texas, no contexto de *Dirofilaria immitis* e prevalência de patógenos transmitidos por carrapatos. **Jornal de medicina interna veterinária**, v. 33, n.1, p.158-166, 2019.
- JANSEN A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasitas. Vectores**. v. 11, n.502, p. 1-25, 2018.
- JIMENEZ-COELLO, M.; SHELITE, T.; CASTELLANOS-GONZALES, A.; SILDARRIAGA, O.; RIVERO, R.; ORTEGA-PACHECO, A.; ACEVEDO-ARCIQUE, C.; AMAYA-GUARDIA, K. GARG, N.; MELBY, P.; TRAVI, B.L. Eficácia da amplificação da recombinase polimerase para diagnosticar a infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães com alterações cardíacas de uma área endêmica do México. **Doenças transmitidas por vetores e zoonóticas**, v. 18, n.8, p.417-423, 2018.
- LASSERSON T.J.; THOMAS, J.; HIGGINS, J.P.T. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions**.2021. Disponível em: <https://training.cochrane.org/handbook/current/chapter-01> Acesso em: 25 mai.2023
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Control, interrupción de la transmission y eliminación de la enfermedad de Chagas como problema de salud pública. **Guía de evaluación, verificación y validación**. 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51648>. Acesso em: 27/ abr. 2023.
- PAGE M. J. MCKENZIE, J.E.; BOSSUYT, P.M.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T.C.; MULROW, C.D.; SHAMSEER, L.; TETZLAFF, J.M.; AKL, E.A.; BRENNAN, S.E.; CHOU, R.; GLANVILLE, J. GRIMSHAW, J.M.; HRÓBJARTSSON, A.; LALU, M.M.; LI, T.; LODER, E.W.; MAYO-WILSON, E.; MCDONALD, S. MCGUINNESS, L.A.; STEWART, L.A.; THOMAS, J.; TRICCO, A.C.; WELCH, V.A.; WHITING, P. MOHER, D. The Prisma 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **Research Methods And Reporting**. v.372, n.71, p.1–15, 2021.
- PEREIRA, H. S.; PEREIRA H.S.; SCOFIELD, A.; JÚNIOR, P.S.B. SANTOS, D.L.; SIQUEIRA, J.S.; CHAVES, J.F.; CARDOSO R.J.; LIMA A.H.A; SARMENTO, N.M.F.P.; JÚNIOR, F.D.; BARROS F.N.; FARIAS, D.M.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; MENDES-OLIVEIRA, A.C.; RIET-CORREA, G, VALIRIA.; CERQUEIRA, D. Chagas disease in urban and peri-urban environment in the Amazon: Sentinel hosts, vectors, and the environment. **Acta Tropica**. v. 217, p.1-9, 2021.

QVARNSTROM, Y. SCHIJMAN, A.G.; VERON, V.; AZNAR, C.; STEURER, F. SILVA, A.J. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.7, p. 1-9, 2012.

SILVA, R. A. ZAICANER.R.; ROSA, M.P.; AUN, G.C.G; MUNIZ, J.C.; MAGALHÃES, A.C.; PEREIRA, C.; PENA, A.R.; SANTOS, M.F. Nepomuceno. Colonization of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in an urban area and its association with *Didelphis marsupialis* in the metropolitan region of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 54, 2021.

STEWART, L. A.; CLARKE, M.; ROVERS, M.; RILEY, L.D.; SIMMONDS, M.; STEWART, G.; TIERNEY, J.F. Preferred reporting items for a systematic review and meta-analysis of individual participant data: the PRISMA-IPD statement. **Jama**, v. 313, n. 16, p. 1657-1665, 2015.

TAHIR, D. DAVOUST, B.; HEU, K.; LAMOUR, T. DEMAR, M.; MARIÉ, J.; BLANCHET, D. Investigação molecular e sorológica da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães na Guiana Francesa. **Parasitologia Veterinária: Estudos e Relatórios Regionais**. v. 12, p. 106-109, 2018.

TOMASINI N. Introgression of the kinetoplast DNA: an unusual evolutionary journey in *Trypanosoma cruzi*. **Curr Genomics**. v.19, n.2 p. 133–139, 2018.

VELASKO, A. MORILLO, C. A.Chagas heart disease: **A contemporary review**. **Journal of nuclear cardiology**. v. 27, n.2, p.445-451, 2020.

WEHRENDT, D. P.; GÓMEZ-BRAVO, A.; RAMIREZ, J.C.; CURA, C. PECH-MAY, A.; RAMSEY, J.M.; ABRIL, M. GUHL, F.; SCHIJMAN, A.G. Development and evaluation of a duplex TaqMan qPCR assay for detection and quantificat. **Parasitas e vetores**. v. 12, n.1, p.1-9, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2020.Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em: 04 abr. 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION.2023. **Chagas disease (also known as American tropossomiasis)**. 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 04 abr. 2023

ZECCA, I. B.; HODO, C.L.; SLACK, S.; AUCKLAND, L. RODGERES, S.; KILLETS, K. C.; SAUNDERS, A.B.; HAMER, S.A. Prevalência da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e achados histológicos associados em gatos domésticos (*Felis catus*). **Parasitologia Veterinária**. v. 278, p.1-37, 2020.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**. v. 184, p.38–52, 2018.

Anna Clara Paulino de Queiroz

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. UFCG-CSTR.

Tassia Laicya Vieira de Souza

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. UFCG-CSTR.

Marcia Almeida de Melo

Doutora em Biologia Parasitária. Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal.UFCG-CSTR.
