

# Análise morfológica, biológica e molecular confirmam a infecção de macacos mantidos em cativeiro por *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* no Brasil

Morphological, biological and molecular analysis confirm the infection of monkeys kept in captivity by *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* in Brasil

Flavia Maia da Silva<sup>1</sup>; Arlei Marcili<sup>1</sup>; Paola Andrea Ortiz<sup>1</sup>; Sabrina Epiphany<sup>2</sup>; Marta Campaner<sup>1</sup>; Jeffrey Jon Shaw<sup>1</sup>; Erney Plessmann de Camargo<sup>1</sup> & Marta Maria Geraldete Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo (USP)

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Artigo original: Maia da Silva, F.; Marcili, A.; Ortiz, P.A.; Epiphany, S.; Campaner, M.; Catão-Dias, J.L.; Shaw, J.J.; Camargo, E.P.; Teixeira, M.M. 2010. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. *Infect. Genet. Evol.* 10(4):522-9.

**Resumo.** Neste estudo, caracterizamos tripanossomas isolados de ratos domésticos e de macacos mantidos em cativeiro, com morfologia similar a *T. (H.) lewisi*. Inferências filogenéticas utilizando sequências de SSU rDNA agruparam os novos isolados brasileiros com *T. (H.) lewisi* e as outras espécies relacionadas do subgênero *Trypanosoma (Herpetosoma)* em um clado homogêneo. O comportamento biológico dos isolados de macaco em cultura e em ratos infectados experimentalmente foi compatível com *T. (H.) lewisi*. Para esclarecer o relacionamento entre as espécies dentro do clado *T. (H.) lewisi*, sequências polimórficas de ITS1 rDNA foram analisadas. Os resultados confirmam que os novos isolados de ratos e macacos do Brasil são *T. (H.) lewisi*, espécie que até recentemente era considerada restrita a roedores, mas que já se mostrou um parasita oportunista de primatas em casos de infecções humanas na Ásia.

**Palavras-chave.** *Trypanosoma lewisi*, macacos, infecção oportunista, diagnóstico molecular, relações filogenéticas.

**Abstract.** In this study we characterize trypanosomes isolated from domestic rats and captive monkeys, with morphology similar to *T. (H.) lewisi*. Phylogenetic inference using SSU rDNA sequences clustered new Brazilian isolates with *T. (H.) lewisi*, forming a homogeneous clade separate from other species of the subgenus *Trypanosoma (Herpetosoma)*. Behaviour of the monkey isolates in culture and in experimentally infected rats was also compatible with *T. (H.) lewisi*. To clarify the relationship between the species within the clade *T. (H.) lewisi*, polymorphic ITS1 rDNA sequences were analyzed. The results confirm that the strains of rats and monkeys of Brazil are closely related and confirm that the new isolates are *T. (H.) lewisi*, a species that until recently was considered to be restricted to rodents. Cases of human infections in Asia suggest that *T. (H.) lewisi* may be an opportunistic parasite of primates.

**Keywords.** *Trypanosoma lewisi*, monkeys, opportunist infection, molecular diagnosis, phylogenetic relationships.

## Introdução

*Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi*, a espécie tipo do subgênero *Trypanosoma (Herpetosoma)*, assim como outras espécies a ela relacionadas, são tripanossomas não pa-

togênicos que infectam uma grande variedade de mamíferos e usualmente apresentam especificidade pelo hospedeiro. Além de espécies cosmopolitas que infectam ratos, algumas espécies têm uma distribuição mais restrita, de acordo com a distribuição geográfica de seus hospedeiros.

Contato do autor:

fmaia@usp.br

Recebido 25nov10

Aceito 24mai11

Publicado 22jul11

A maioria destes tripanossomas é parasita de roedores, mas raras ocorrências foram descritas em lagomorfos, primatas e morcegos (Hoare, 1972). As pulgas (*Siphonaptera*) são os vetores para a maioria das espécies deste subgênero, no entanto algumas evidências sugerem que triatomíneos poderiam ser vetores de algumas espécies que ocorrem nas Américas Central e do Sul (Hoare, 1972; Molyneux, 1976; D'Alessandro & Behr, 1991).

Estudos filogenéticos demonstraram a polifilia do subgênero *T. (Herpetosoma)*, separado em dois clados, *T. (H.) rangeli* e *T. (H.) lewisi* (Maia da Silva e cols., 2004). Tripanossomas do clado *T. (H.) lewisi* possuem formas sanguíneas morfologicamente indistinguíveis e muito similares a *T. (H.) rangeli*, características que os agrupam no subgênero *Trypanosoma (Herpetosoma)* (Hoare, 1972). Diferente de *T. (H.) rangeli*, transmitido através da inoculação de formas metacíclicas presentes nas glândulas salivares dos triatomíneos, uma característica da Secção Salivaria, *T. (H.) lewisi* e todas as demais espécies são transmitidas por fezes contaminadas, típicas da Secção Stercoraria. Espécies do clado *T. (H.) lewisi* se desenvolvem no tubo digestivo de pulgas como epimastigotas aderidos ao intestino e/ou reto. Animais são infectados através das fezes de pulgas contaminadas ou por ingestão do inseto inteiro (Hoare, 1972; Molyneux, 1976; D'Alessandro & Behr, 1991). Além da morfologia, os membros do clado *T. (H.) lewisi* são caracterizados por compartilhar as seguintes características: a) não patogenicidade para os hospedeiros mamíferos; b) suposta ou comprovada (para espécies com as quais foram desenvolvidos experimentos de infecção cruzada com outras espécies de roedores diferente da espécie hospedeira natural) restrição ao hospedeiro; c) ampla distribuição geográfica (Hoare, 1972; Molyneux, 1976; D'Alessandro & Behr 1991).

Tripanossomas *T. (H.) lewisi-like* raramente são encontrados em primatas, com poucos relatos em chimpanzé e gorilas na África. Há um relato de macaco aranha na Guiana Francesa infectado por *T. (H.) lewisi-like* (Hoare, 1972; Marinkelle, 1966). Dados sobre estes tripanossomas são restritos a morfologia das formas sanguíneas, e não há culturas disponíveis. *T. (H.) lewisi-like* foi descrito por Lainson e cols (2004) em *Sciurus spadiceus* (um roedor do grupo dos esquilos) na Amazônia brasileira, baseado na morfologia das formas sanguíneas, infecção em camundongos e em triatomíneos. Baseados no último critério, os autores determinaram que a infecção era por *T. (H.) lewisi-like* e não por *T. (H.) rangeli*. Embora *T. (H.) lewisi* seja considerado uma espécie não infectante para humanos, alguns poucos casos de humanos infectados com *T. (H.) lewisi-like* tem sido descritos na Ásia.

Um caso descrito por Johnson (1933) ocorreu em uma criança de 4 meses na Malásia, dois outros casos foram descritos por Shrivastava (1974) em um casal na Índia, infecção por *T. (H.) lewisi-like* foi detectada também em uma criança na Tailândia (Sarataphan e cols., 2007). Análises de sequências de ITS1 rDNA dos tripanossomas isolados da criança e de roedores da Tailândia apresentaram 96.4% de similaridade, sugerindo que os roedores são a possível origem da exposição humana ao *T. (H.) lewisi*

na região. (Jittapalpong e cols., 2008).

A restrição de espécies do clado *T. (H.) lewisi* tem sido atualmente debatida, com os dados recentes que demonstram que humanos podem ser infectados por estas espécies quando vivem em estreita associação com roedores e suas pulgas. Tripanossomas *T. (H.) lewisi-like* são considerados altamente restritos ao hospedeiro, apesar da alternância de hospedeiros mediada pelos vetores (pulgag) já relatados entre gêneros/ subfamílias de roedores que vivem em simpatria (Noyes e cols., 2002).

Para elucidar a relação parasita-hospedeiro entre *T. (H.) lewisi* de roedores e *T. (H.) lewisi-like* de primatas não humanos, caracterizamos sete novos isolados, sendo 4 isolados de ratos domésticos e 3 de macacos de cativeiro, por morfologia, comportamento em cultura e em animais experimentalmente infectados e através de marcadores moleculares.

## Métodos

### Isolamento de tripanossomas, manutenção e cultivo

Neste estudo nós caracterizamos 7 isolados brasileiros de *T. (H.) lewisi* provenientes de 4 ratos domésticos (*Rattus norvegicus*) provenientes dos estados do Ceará e de São Paulo e primatas não humanos (*Aotus sp*, *Callithrix jacchus* e *Alouatta fusca*) mantidos em cativeiro no zoológico de Mogi-Mirim (São Paulo), obtidos por hemocultura utilizando meio bifásico (Maia da Silva e cols., 2004). As espécies de tripanossomas isoladas foram mantidas no mesmo meio de isolamento a 28°C. Todos os isolados estão criopreservados na "Trypanosomatid Culture Collection (TCC)" do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

### Infecção experimental de ratos e camundongos e estudo morfológico de formas sanguíneas e de cultura de *T. lewisi-like*

Para o estudo morfológico dos novos isolados de tripanossomas, foram preparados esfregaços de sangue de ratos infectados natural e experimentalmente, e amostras de culturas em fase logarítmica e estacionária. Os esfregaços foram fixados com metanol e corados com Giemsa.

Formas metacíclicas provenientes de culturas em fase estacionária do novo isolado de *T. lewisi* de macaco foram inoculada em ratos (Wistar) e camundongos (Balb/c). Os níveis de parasitemia foram monitorados através de exame por microhematócrito (MH) no período de 1-6 dias pós-infecção (p.i.)

### Amplificação por PCR de SSU e ITS1 rDNA

Fragmentos de DNA contendo a sequência completa do gene SSU rDNA (Small Subunit do gene ribossômico) foram amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenciadas como descrito previamente (Ferreira e cols., 2008).

A amplificação de sequências de ITS1 rDNA (Internal Transcribed Spacer 1) foi feita utilizando oligonucleotídeos complementares as sequências que flanqueiam a SSU rDNA e 5.8S rDNA gerando um fragmento de ~500

pares de bases (pb) que inclui a sequência completa do ITS1 rDNA (~421pb) como descrito previamente (Maia da Silva e cols., 2004; Rodrigues e cols., 2006). Todas as sequências determinadas neste estudo foram depositadas no GenBank.

Fragmentos de DNA amplificados por PCR e purificados foram clonados em vetor pCR 2.1, utilizando os Kit TA Cloning (Invitrogen) e utilizados para a transformação em células dh10b. Os clones positivos foram ampliados por cultivo em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e purificados utilizando o sistema "Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System" (Promega). Fragmentos de DNA amplificados por PCR não clonados (SSU rDNA) e clonados (ITS1 rDNA) foram sequenciados utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) e ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).

#### Análise de sequências e inferências filogenéticas.

As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de outros tripanossomas disponíveis no GenBank utilizando Clustal X (Thompson e cols., 1997). Os alinhamentos das sequências foram ajustados manualmente. Inferências filogenéticas pelos métodos de Máxima Parsimônia e Máxima Verossimilhança realizadas neste estudo foram desenvolvidas de acordo com estudos anteriores de nosso grupo (Ferreira e cols., 2008, Viola e cols., 2009).

## Resultados

### Morfologia, crescimento e diferenciação em cultura de isolados brasileiros de *T. lewisi*-like

As morfologias de formas de cultura de isolados brasileiros de ratos e de macacos revelaram-se indistinguíveis. As formas encontradas no sangue de ratos natural ou experimentalmente infectados apresentaram tripomastigotas típicos de *T. (H.) lewisi*. No entanto não pudemos detectar tripanossomas em esfregaços de sangue dos macacos infectados.

O crescimento e a diferenciação de tripanossomas isolados de roedores e de macacos foram comparados em cultura em fases logarítmica e estacionária. Culturas em fase logarítmica mostraram uma intensa multiplicação de formas epimastigotas, apresentando formas livres, inúmeros conglomerados de pequenos e arredondados flagelados aderidos à garrafa de cultura, e formas de transição de morfologia e tamanhos de corpo e flagelo variáveis. Culturas em fase estacionária revelaram poucas formas epi- e tripomastigotas longas juntamente com um grande número de tripomastigotas metacíclicas.

### Comportamento de *T. lewisi*-like de primatas não humanos (*Aotus sp.*, *Callithrix jacchus* e *Alouatta fusca*) inoculados em ratos e camundongos

Para esclarecer a relação entre *T. lewisi* de roedores e isolados de macaco, comparamos as características morfológicas das formas sanguíneas e o comportamento biológico (capacidade de estabelecer a infecção, multipli-

cação, parasitemia e presença de formas no rim, fígado, baço e coração) em ratos e camundongos experimentalmente infectados.

Os isolados de macacos foram capazes de infectar experimentalmente ratos Wistar, avaliado por microhematócrito (MH). O pico de parasitemia foi detectado no 4º dia p.i., decrescendo gradualmente até desaparecer no 6º dia p.i. A morfologia das formas tripomastigotas encontradas no sangue destes animais foi idêntica às formas presentes no sangue de ratos naturalmente infectados por *T. (H.) lewisi*. Formas em divisão foram observadas somente durante os quatro primeiros dias p.i., e formas que não se dividiam foram observadas até o sexto dia p.i. Amostras de sangue de ratos que estavam negativos para tripanossomas na análise por MH (seis dias p.i.) mostraram-se positivas por hemocultura.

Amostras de sangue com tripomastigotas provenientes dos ratos experimentalmente infectados (descritos anteriormente) foram inoculadas em outro rato Wistar, apresentando o mesmo padrão de infecção observado nas infecções com formas tripomastigotas metacíclicas de cultura.

Por outro lado, esses isolados de macaco não foram capazes de infectar camundongos Balb/c inoculados com formas de cultura. Os animais foram monitorados durante 15 dias p.i., através de MH e hemocultura.

### Relações filogenéticas e polimorfismo entre os isolados de *T. lewisi* baseadas nas sequências de SSU rDNA e ITS1 rDNA

Sequências de SSU rDNA e ITS1 rDNA dos novos isolados de *T. (H.) lewisi* - like descritos neste estudo foram determinadas, alinhadas com sequências de outras espécies do subgênero *Trypanosoma (Herpetosoma)* e utilizadas em inferências filogenéticas.

Baseado na topologia das árvores geradas, todos os isolados brasileiros foram identificados como pertencentes ao grupo *T. (H.) lewisi* e estreitamente relacionados às outras espécies do subgênero *Trypanosoma (Herpetosoma)*, formando um clado monofilético.

Para melhor esclarecer o relacionamento entre os isolados brasileiros de *T. (H.) lewisi*, nós comparamos sequências da região da SSU rDNA dos novos tripanossomas isolados de ratos e macacos, e os demais isolados de *T. (H.) lewisi* provenientes de humanos e roedores de diferentes origens geográficas e outras espécies de *Trypanosoma (Herpetosoma)* de diferentes hospedeiros disponíveis no GenBank. Os isolados brasileiros foram agrupados com 100% de similaridade de sequência e com ~98% de similaridade com isolados de referência de *T. (H.) lewisi* (Molteno B3 e ATCC 30085).

Filogenia usando sequências de SSU rDNA posicionaram todos os isolados de macaco no clado *T. (H.) lewisi* junto com todos os isolados de rato, confirmando a classificação dos novos isolados como *T. (H.) lewisi* dentro do subgênero *Trypanosoma (Herpetosoma)* e distante de *T. rangeli* e *T. (Schyzotrypanum) cruzi*, espécies também encontradas em primatas neotropicais e roedores (Maia da Silva e cols., 2008; Marcili e cols., 2009), e de *T. (Mega-*

*trypanum conorhini*, uma espécie também muito comum em ratos. As análises baseadas nas sequências conservadas de SSU rDNA determinadas neste estudo não foram capazes de discriminar os isolados brasileiros de ratos dos isolados provenientes de macacos, e também não separaram estes isolados de *T. (H.) lewisi*, *T. (H.) musculi*, *T. (H.) blanchardi* e *T. (H.) rabinowitschae*, os quais também são espécies de *Trypanosoma (Herpetosoma)*.

A análise do polimorfismo de ITS1 rDNA tem sido o método utilizado para o diagnóstico de *T. (H.) lewisi* em ratos de laboratório (Desquesnes e cols., 2002) e em infecções humanas (Sarataphan e cols., 2007). Os fragmentos de ITS1 rDNA amplificados por PCR dos isolados brasileiros apresentaram o tamanho esperado para *T. (H.) lewisi* e indistinguível das demais espécies de *Trypanosoma (Herpetosoma)*. Embora capaz de diferenciar *T. (H.) lewisi* das espécies de tripanossomas africanos e de *T. cruzi*, este método não permite distinguir *T. (H.) lewisi* de alguns isolados de *T. rangeli* que infectam humanos, requisito desnecessário na África (onde não há ocorrência de *T. (H.) rangeli* mas indispensável nas Américas Central e do Sul (Maia da Silva e cols., 2008).

A análise comparativa das sequências de ITS1 rDNA, confirma que os isolados brasileiros provenientes de macacos estão muito relacionados aos isolados de *T. (H.) lewisi* de ratos (~97.3 a 100% similaridade) e diferem das demais espécies do subgênero *Herpetosoma* (~88 a 70% de similaridade).

## Discussão

Nos últimos dez anos nosso grupo tem pesquisado a presença de *Trypanosoma* em macacos de cativeiro e que vivem livres na natureza principalmente na região Amazônica brasileira. Embora mais de 200 macacos de espécies diferentes foram examinados em nossos trabalhos, e aproximadamente 90 culturas foram obtidas, nunca encontramos outras ocorrências de tripanossomas *T. (H.) lewisi*, além das descritas neste estudo. (Maia da Silva e cols., 2004, 2008; Marcili e cols., 2009).

Neste estudo, pela primeira vez, isolados de macacos (*Aotus sp*, *Callithrix jacchus* e *Alouatta fusca*) foram classificados como *T. (H.) lewisi* baseado em características morfológicas, biológicas e moleculares. Em diversos levantamentos de tripanossomas em macacos neotropicais raramente são detectadas infecções por *T. (H.) lewisi*, sugerindo que esta espécie não é um parasita natural de primatas. Neste estudo nós detectamos a ocorrência de *T. (H.) lewisi* somente em macacos de cativeiro, o que sugere uma infecção oportunista em animais submetidos a condições de estresse, infestados por pulgas e que vivem próximos a locais infestados por ratos domésticos, hospedeiros naturais de *T. (H.) lewisi*.

Apesar da descoberta de *T. (H.) lewisi* e *T. (H.) lewisi-like* em primatas humanos e não humanos, esses tripanossomas exibem uma considerável restrição pelo hospedeiro na natureza, e *T. (H.) lewisi* continua a ser um parasita de *Rattus spp*. Ferrante (1985) relatou a incapacidade de *T. (H.) lewisi* para infectar uma variedade de mamíferos, e a associou à atividade de tripanolíticos do complemento

e granulócitos. Assim, um sistema imunológico imaturo ou comprometido pode tornar esta espécie um parasita oportunista.

A existência de ratos infectados e a exposição de macacos em cativeiro a pulgas infectadas poderiam ser a origem da alternância de *T. (H.) lewisi* de ratos para macacos. Casos humanos infectados por *T. (H.) lewisi* na Tailândia e na Malásia foram também atribuídos à presença de ratos e pulgas, bem como a imunodepressão do hospedeiro vertebrado, sugerindo que *T. (H.) lewisi* sejam parasitas oportunistas de primatas, o que poderia explicar a infecção de hospedeiros filogeneticamente distantes.

Embora, alguns autores tenham descrito infecções experimentais de outros roedores, inoculando um grande número de formas tripomastigotas metacíclicas no sangue, as infecções são curadas em um tempo muito menor comparado com uma infecção natural por *T. (H.) lewisi* no rato (Haore 1972; Molineux, 1976). Os recentes relatos de infecções humanas com *T. (H.) lewisi* e *T. (H.) lewisi-like* sugeriram que essa infecção deve ser mais comum do que relatada porque, em geral, a infecção é transitória e desaparece sem tratamento específico.

Futuros estudos são necessários para demonstrar se *T. (H.) lewisi* pode causar infecção persistente em primatas humanos e não humanos ou se eles simplesmente representam infecções acidentais e esporádicas, como discutido por Lun e cols. (2009).

## Contribuição dos autores

Concepção e delineamento dos experimentos: Maia da Silva, F.; Teixeira, M. M. G. Execução dos experimentos: Maia da Silva, F.; Marcili, A.; Ortiz, P. A.; Epiphanyo S.; Campaner, M. Análise dos resultados: Maia da Silva, F.; Camargo, E. P.; Teixeira, M. M. G. Redação do artigo: Todos os autores contribuíram na redação do artigo.

## Bibliografia

- D'Alessandro, P. A. & Behr, M. A., 1991. *Trypanosoma lewisi* and its relatives. In: Krerer, J. & Baker, J. R. (Eds.), Parasitic Protozoa. Academic Press, New York, pp 225-263.
- Desquesnes, M., Ravel, S., Cuny, G., 2002. PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. Kinetoplastid Biol. Dis. 1, 2.
- Ferrante, A., 1985. Trypanolytic activity, agglutinins, and opsonins in sera from animals refractory to *Trypanosoma lewisi*. Infect. Immun. 49, 378-382.
- Ferreira, R.C., De Souza, A.A., Freitas, R.A., Campaner, M., Takata, C.S.A., Barrett, T.V., Shaw, J.J., Teixeira, M.M.G., 2008. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. J. Euk. Microbiol. 55, 427-435.
- Hoare, C.A., 1972. The Trypanosomes of Mammals, a Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, p 749.
- Jittapalpong, S., Inpankaew, T., Sarataphan, N., Herbreteau, V., Hugot, J.P., Morand, S., Stich, R.W., 2008. Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand. Infect. Genet. Evol. 8, 445-449.

- Johnson, P.D. 1933. A case of infection by *Trypanosoma lewisi* in a child. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 26, 467-468
- Lainson, R., Brígido, M.C., Silveira, F.T., 2004. Blood and intestinal parasites of squirrels (Rodentia: Sciuridae) in Amazonian Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 577-579.
- Lun, Z.R., Reid, S.A., Lai, D.H., Li, F.J., 2009. Atypical human trypanosomiasis: a neglected disease or just an unlucky accident? *Trends Parasitol.* 25, 107-108.
- Maia da Silva, F., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A.C., Coura, J.R., Añez, N., Shaw, J.J., Stevens, J.R., Teixeira, M.M.G., 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129, 549-561.
- Maia da Silva, F., Naiff, R.D., Marcili, A., Gordo, M., D'Afonseca Neto, J.A., Naiff, M.F., Franco, A.M.R., Campaner, M., Valente, V., Valente, A.S., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Miles, M., 2008. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop.* 107, 168-173.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009a;39(5):615-23.
- Marinkelle, C.J., 1966. Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60, 109-116.
- Molyneux, D., 1976. Biology of the trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma*. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D. A (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, pp. 285-325.
- Noyes, H.A., Ambrose, P., Barker, F., Begon, M., Bennet, M., Bown, K.J., Kemp, S.J., 2002. Host specificity of *Trypanosoma (Herpetosoma)* species: evidence that bank voles (*Clethrionomys glareolus*) carry only one T. (H.) evotomys 18S rRNA genotype but wood mice (*Apodemus sylvaticus*) carry at least two polyphyletic parasites. *Parasitology* 124, 185-190.
- Rodrigues, A.C., Paiva, F., Campaner, M., Stevens, J.R., Noyes, H.A., Teixeira, M.M.G., 2006. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 132, 215-224.
- Sarataphan, N., Vongpakorn, M., Nuansrichay, B., Autarkool, N., Keowkarnkah, T., Rodtian, P., Stich, R.W., Jittapalapong S., 2007. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. *J. Med. Microbiol.* 56, 1118-1121.
- Shrivastava, K.K., Shrivastava, G.P., 1974. Two cases of *Trypanosoma (Herpetosoma)* species infection of man in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 3-4.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Viola, L.B., Attias, M., Takata, C.S., Campaner, M., De Souza, W., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2009. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake *Trypanosomes*: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56, 594-602.