

## Parte I – Conceitos atuais em doença de Chagas humana e experimental

3. A ecologia e a complexidade dos ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na natureza

Tania C. Araújo-Jorge  
Solange L. de Castro  
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

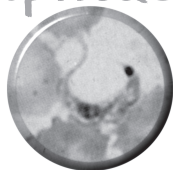


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

## Capítulo 3



# A Ecologia e a Complexidade dos Ciclos de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* na Natureza

Ana Maria Jansen, Cristiane V. Lisboa, Ana Paula S. Pinho, Renato Sérgio Marchewski, Regina H.R. Mangia, Elisa Cupolillo & Octavio Fernandes

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado digenético pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, é um dos parasitas de maior e mais bem-sucedida distribuição na natureza. Capaz de infectar um amplo espectro de mamíferos, distribuídos entre oito ordens, é transmitido principalmente através de contaminação de fezes infectadas dos vetores, triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*.

Um dos aspectos mais interessantes e discutidos do *T. cruzi* é a extrema variabilidade intra-específica. A estrutura populacional do parasita é clonal e uma das hipóteses que explicaria a significativa variabilidade genética deste parasita seria uma divergência e a evolução clonal antiga e independente (Tibayrenc & Ayala, 1988).

Classicamente admitem-se dois ciclos de transmissão: o ciclo doméstico envolvendo o homem, animais sinantrópicos, domésticos e triatomíneos domiciliados, e o ciclo silvestre envolvendo animais e triatomíneos silvestres. A invasão do ecótopo silvestre pelo homem ou a domiciliação de triatomíneos e/ou mamíferos silvestres explicariam a ligação entre estes dois ciclos. No entanto, temos observado que o assim chamado ciclo silvestre do *T. cruzi* é bem mais complexo, na medida em que, em um mesmo segmento de floresta, podem ocorrer distintos e independentes ciclos de transmissão e que o estabelecimento de um ciclo domiciliar dependerá da presença de animais infectados com uma determinada subpopulação do parasita (Fernandes et al., 1993).

### 3.1 A Heterogeneidade da Espécie

As distintas formas sangüícolas chamaram a atenção dos primeiros pesquisadores que estudaram a biologia do parasito. Assim, considerava-se serem as formas finas e largas, gametas masculinos e femininos, respectivamente (Chagas, 1909) formas jovens e adultas (Brumpt, 1912). Depois destes estudos iniciais, as várias tentativas que vêm sendo feitas no sentido de correlacionar alguma característica morfológica, biológica ou bioquímica dos isolados com as diferentes formas da doença humana ou com o curso da infecção em animais de laboratório, chegaram a resultados ainda bastante controvertidos (Brenner, 1973; Gonçalves et al., 1984; Luquetti et al., 1986; Carneiro et al., 1991). No entanto, marcadores bioquímicos e moleculares têm permitido esclarecer alguns aspectos da epidemiologia do parasita. A análise do perfil eletroforético de enzimas isofuncionais de numerosos isolados obtidos de doentes humanos, reservatórios silvestres e triatomíneos permitiu que se definissem três zimodemas (Z1, Z2 e Z3), de acordo com a circulação do parasita no ambiente domiciliar (Z2) ou silvestre (Z1 e Z3) (Miles et al., 1977; Barrett et al., 1980). A análise do perfil eletroforético dos produtos de

digestão de DNA do cinetoplasto por enzimas de restrição discriminou ainda mais a heterogeneidade do parasita (Gonçalves et al., 1984). A possibilidade de caracterizar, bioquimicamente, as subpopulações do *T. cruzi*, demonstrou que a variabilidade desta espécie pode ser maior do que aquela encontrada em outros *taxa* bem definidos e que os métodos de manutenção do parasita *in vitro* e *in vivo* favoreciam ou eliminavam subpopulações e/ou clones (Dvorak et al., 1972; Deane et al., 1984).

Caracterizações moleculares (RAPD - *randomly amplified polymorphic DNA* e seqüências de genes de minixon e da subunidade 24Sa ribossomal) sugeriram duas linhagens distintas e bastante distantes filogeneticamente. A linhagem 1 foi correlacionada ao ciclo domiciliar e a linhagem 2 ao ciclo silvestre de transmissão do *T. cruzi*. Mais recentemente as subpopulações de *T. cruzi* foram agrupadas em dois grandes grupos. Assim, isolados caracterizados como zimodema 1, linhagem 2, tipo III e ribodema II/III, passaram a compor o grupo *T. cruzi* I. As subpopulações caracterizadas como zimodema 2, linhagem 1, tipo II e ribodema I foram incluídas no grupo *T. cruzi* II (Andrade et al., 1974; Miles et al., 1977; Clark & Pung, 1994; Tibayrenc, 1995; Souto et al., 1996; Zingales et al., 1997; Luquetti et al., 1999).

### 3.2 As Peculiaridades da Infecção nos Mamíferos Silvestres

Embora se saiba que basicamente cada espécie de mamífero e/ou triatomíneo possa representar um elemento selecionador de subpopulações do parasita, pouco se conhece sobre a dinâmica da transmissão do *T. cruzi* na natureza e as variáveis bióticas e abióticas envolvidas. Os estudos realizados, na maioria das vezes, refletem situações momentâneas da enzootia, sem aprofundar a questão das diferentes interações entre os reservatórios, vetores e seus padrões comportamentais que certamente são fundamentais na manutenção e dispersão dessa protozoose.

Os estudos sobre a interação do *T. cruzi* com marsupiais da Família Didelphidae, que são considerados os mais antigos e importantes reservatórios do parasita (Stevens et al., 1998), não só resultaram no esclarecimento de numerosas questões relacionadas com a biologia e epidemiologia do *T. cruzi*, mas também levantaram outras tantas:

- a) observou-se que gambás controlam a infecção pelo *T. cruzi* desde muito jovens (45 dias, ainda inteiramente dependentes do marsúpio). Representam um “filtro biológico” bastante seletivo: mantêm indefinidamente, com alto percentual de hemocultivos positivos, as infecções experimentais por cepa F e isolados silvestres, todos de zimodema 1, mas controlam muito rapidamente, chegando em alguns casos a eliminar, as infecções experimentais pelas cepas Y e FL (Deane et al., 1984; Jansen et al., 1997);
- b) o ciclo do *T. cruzi*, como é conhecido, envolve duas fases de multiplicação, uma intracelular, na forma amastigota em diversos tecidos do hospedeiro vertebrado e a outra inteiramente extracelular como epimastigota na luz do tubo digestivo do inseto vetor. Entretanto, Deane et al. (1984) observaram que os dois ciclos podem ocorrer simultaneamente no gambá *Didelphis marsupialis*, no qual o parasita pode multiplicar-se extracelularmente (na forma epimastigota) e diferenciar-se na luz das glândulas de cheiro. O encontro, nestas glândulas do *D. marsupialis*, de formas evolutivas do *T. cruzi* antes descritas apenas no tubo digestivo dos triatomíneos, demonstrou ser o gambá ao mesmo tempo reservatório e vetor, e apontou a necessidade de revisão cuidadosa da biologia dos tripanosomatídeos de um modo geral, e do *T. cruzi* em particular, a fim de esclarecer a importância deste achado na manutenção do parasita na natureza. Vale assinalar que glândulas de cheiro são encontradas na grande maioria dos mamíferos e estão relacionadas a numerosos padrões comportamentais tais como acasalamento, defesa e marcação de território. Tripanosomatídeos em geral, e o *T. cruzi* em particular, são parasitas extremamente ecléticos no que se refere a substrato nutricional e aos diversos microhabitats oferecidos pelos numerosos hospedeiros (Vickerman, 1994). A adaptação do parasita às glândulas de cheiro, hábitat tão inusitado, reflete este ecletismo e é provavelmente uma aquisição secundária na história da interação do *T. cruzi* com o gambá (Jansen et al., 1997).

A importância epidemiológica do parasitismo nas glândulas de cheiro ainda é desconhecida, já que não se avaliou a sua capacidade vetorial. Vale mencionar que, se por um lado o encontro de gambás com parasitas nas

glândulas de cheiro é raro (Naiff et al., 1987; Steindel et al., 1988; Fernandes, 1993), por outro, surtos endêmicos de malária ou leishmaniose se mantêm com índices de infecção dos vetores em torno de 1%. São vários os relatos na literatura de alta prevalência de infecção natural entre gambás onde a população de triatomíneos é praticamente ausente; portanto, a raridade de glândulas de cheiro naturalmente infectadas não exclui a possibilidade de ser este um mecanismo importante na manutenção da circulação de *T. cruzi* no meio ambiente. Epidemias circunscritas da doença de Chagas, não explicáveis pelos mecanismos habituais de transmissão por triatomíneos, são de há muito conhecidas. Muito antes da descrição do ciclo do *T. cruzi* nas glândulas anais do gambá, já se havia sugerido uma correlação entre a presença de gambás e um surto epidêmico da doença de Chagas em Nova Teutônia, RS (Nery-Guimarães et al., 1968). Em condições artificiais foi possível infectar camundongos com alimentos contaminados com conteúdo de glândulas de cheiro infectadas.

Avaliando, comparativamente, o curso da infecção natural de gambás e de cuícas (*Philander frenata*), um outro marsupial didelfídeo que vive em simpatria com *D. marsupialis*, observamos que também estes didelfídeos apresentam infecções estáveis por *T. cruzi*, embora não mantenham o ciclo de multiplicação extracelular nas glândulas de cheiro. As lesões histopatológicas não são severas, mas são um pouco mais importantes do que as dos gambás. Este estudo foi realizado em um fragmento de Mata Atlântica de altitude (Teresópolis, RJ) onde se observaram altas taxas de infecção nas duas espécies: 50% em *P. frenata* e 60% de *D. marsupialis*. A busca de vetores resultou na coleta de 23 *R. prolixus*, dos quais 13 estavam infectados.

A caracterização biológica (acompanhamento do curso da infecção experimental em camundongos suíços) separou os isolados de gambás e cuícas em dois grupos distintos: um, bastante virulento para camundongos, onde predominaram os isolados de cuícas, e outro, constituído principalmente por isolados de gambás e barbeiros, que não resultava em mortalidade de camundongos experimentalmente inoculados. A caracterização bioquímica (análise dos perfis eletroforéticos de enzimas isofuncionais) também separou os isolados dos marsupiais em dois grandes grupos: um incluindo todos os isolados dos vetores e a maioria dos isolados de gambás; no outro predominaram os isolados de cuícas.

Foram observados 15 zimodemas e, como era esperado, uma maior variabilidade genética entre os isolados de cuícas. A tipagem molecular (análise da seqüência de gens de minixons) mostrou 40% de cuícas infectadas com subpopulação *T. cruzi* II.

A correlação entre os marcadores empregados não foi absoluta, mas evidenciou a circulação na natureza de subpopulações do *T. cruzi* vinculadas às infecções humanas, além de sua associação preferencial com a cuíca *P. frenata*. Estes resultados, e a observação prévia de que cuícas não são filtros biológicos seletivos, levantaram a hipótese de que estas duas espécies, tão próximas filogeneticamente e que vivem em simpatria, estariam participando de dois ciclos independentes de transmissão do *T. cruzi*. Esta hipótese foi reforçada na medida em que, em condições experimentais, *R. prolixus* foi capaz de manter os dois grupos do parasita.

Esta questão nos levou a estender o espectro de espécies de animais estudados e que ocupassem diferentes estratos florestais na mata. Passamos então a avaliar animais pertencentes às ordens Primata, Rodentia, Quiroptera e Edentata da Reserva Biológica de Poço das Antas.

A Reserva Biológica de Poço das Antas situa-se no município de Silva Jardim, limitando-se com Casimiro de Abreu e Araruama, RJ. A vegetação é caracterizada por florestas secundárias em diferentes estágios sucessionais e por áreas bastante devastadas. O local ainda conta com uma rica fauna de mamíferos típicos e endêmicos e algumas espécies vegetais primárias. Neste local vem sendo desenvolvido um dos mais reconhecidos programas de conservação de espécie animal endêmico e em extinção: o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*). O programa de conservação inclui a reintrodução e a translocação desta espécie (Kleinman et al., 1990; Beck et al., 1991). Dentro do programa de translocação, grupos isolados de micos-leões-dourados encontrados em pequenos fragmentos remanescentes de Mata Atlântica, são transferidos para uma outra reserva (Reserva Biológica União). No programa de reintrodução, fazendas adjacentes à reserva Poço das Antas são repovoadas com micos criados em diversos zoológicos do mundo. Estes programas levam sempre em consideração a distribuição original da espécie.

A maioria dos primatas tem uma estrutura social bastante estável. Cada grupo de micos-leões-dourados conta com quatro a seis indivíduos. Cada membro do grupo fica responsável por diferentes tarefas que incluem

reprodução, cuidado com os filhotes, alimentação e estratégia de defesa. São territoriais, têm atividade diurna, ocupam o estrato arbóreo/intermediário e se abrigam em ocos de árvores.

Até o momento, observamos que o *T. cruzi* circula pelo menos entre quatro ordens de mamíferos da Reserva de Poço das Antas: primata (mico-leão-dourado), edentados (preguiça-de-coleira), roedores (rato silvestre) e marsupiais (gambá).

A enzootia em Poço das Antas apresenta características bastante peculiares quando comparada com Teresópolis. O percentual de marsupiais naturalmente infectados foi 5%, bastante baixo em relação às descrições de outros autores e de nossas observações em outras áreas. Entre os roedores encontramos 13% infectados. Por outro lado, 50% da população de *L. rosalia* se mostrou infectada. Os micos-leões-dourados infectam-se provavelmente logo após o desmame, não tendo sido observada transmissão vertical; pesquisa realizada em quatro animais recapturados entre três e doze meses, mostra que a enzootia está se expandindo, o que pode ser comprovado pela existência da infecção em alto percentual de *L. rosalia* reintroduzidos nas fazendas adjacentes à reserva.

Em todos os grupos examinados encontramos micos-leões-dourados infectados, mas a prevalência foi maior nos grupos que pernoitam no mesmo oco, o que sugere que a fonte da infecção se localize neste local. A caracterização molecular (análise de gens de miniexon) dos isolados de micos-leões-dourados correspondeu à linhagem 1 (*T. cruzi* II), ao contrário dos isolados dos demais animais que correspondem à linhagem 2 (*T. cruzi* I). A caracterização biológica mostrou que estes isolados tendem a ser mais virulentos para camundongos suíços, com taxas de mortalidade entre 40% e 100%. Os isolados dos demais animais resultaram sempre em parasitemia patente baixa, com raros exames de sangue a fresco positivos e 100% de sobrevivência.

Estes resultados confirmam a complexidade do ciclo silvestre do *T. cruzi*, na medida em que observamos distintos ciclos de transmissão, que independem do estrato florestal, podendo acontecer em um mesmo ecótopo.

O encontro de micos-leões-dourados naturalmente infectados por uma subpopulação de *T. cruzi* correlacionada com a infecção humana torna fundamental avaliar a importância desses animais como fonte de dispersão do parasita na natureza e, principalmente, para indivíduos humanos, uma vez que os micos-leões-dourados vêm sendo muito manejados dentro dos programas de reintrodução e translocação acima mencionados. É importante também que sejam repensados todos os programas de translocação e reintrodução não só desta espécie, uma vez que a metodologia usada no projeto mico-leão-dourado serve como modelo para outros programas de conservação de animais em extinção. Além das implicações epidemiológicas deve-se levar em consideração o impacto sobre as outras espécies animais que possa resultar do manejo dos micos infectados.

Nossos resultados mostram que, em relação à circulação do *T. cruzi* na natureza, se deveriam mencionar “os ciclos silvestres do *T. cruzi*” uma vez que vários e independentes ciclos de transmissão podem ocorrer num mesmo segmento de floresta. Mais ainda, os nossos estudos indicam que as variáveis envolvidas na circulação do *T. cruzi* na natureza são únicas para cada área, o que inviabiliza qualquer estudo de impacto ambiental baseado em dados secundários.

Cada vez mais o homem vem intervindo nas florestas em função de diferentes objetivos, que incluem desde a exploração até os numerosos programas de conservação, que sempre resultam em fluxos migratórios humanos, translocação e reintrodução de animais, o que torna obrigatório o conhecimento dos fatores determinantes da dispersão, não somente do *T. cruzi*, mas das parasitoses de um modo geral.

## Referências Bibliográficas

- ANDRADE S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Revista de Patologia Tropical* 3:65-121, 1974.
- BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G. TEIXEIRA, R. & ALMEIDA DE SOUZA, J. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74:84-89, 1980.
- BECK, B. B., KLEIMAN, D. G., DIETZ, J. M., CASTRO, J. & B. RETTBERG-BECK. Losses and reproduction in reintroduced golden lion tamarin. *DoDo* 27: 50-61, 1991.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review Microbiology* 27:240-247, 1973.
- BRUMPT, E. *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhis megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex bourti ornithodoros moubata*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 5:360-367, 1912.
- CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J. & CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86:387-394, 1991.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.
- CLARK, C.G. & PUNG, O. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66:174-179, 1994.
- DEANE, M. P.; JANSEN, A. M. & LENZI, H. L. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:513-515, 1984.
- DVORAK, J. A.; HARTMAN, D. L. & MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *Journal of Protozoology*, 27:472-474, 1972.
- FERNANDES, A. P.; NELSON, K. & BEVERLEY, S. M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origin of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11608-11612, 1993.
- GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S. & MOREL, C. M. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: *Genes and Antigens of Parasites. A laboratory manual*, 2nd ed., Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 95-109.
- JANSEN, A. M.; MADEIRA F.; CARREIRA, J. C.; MEDINA-ACOSTA, E. & DEANE, M. P. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: a study of the correlations and kinetics of the systemic and scent gland infections in naturally and experimentally infected animals. *Experimental Parasitology* 86: 37-44, 1997.
- KLEINMAN, D. G.; BECK, B. B.; BAKER, A. J.; BALLOU, J.D.; DIETZ, L.A. & DIETZ, J. M. The conservation program for the golden lion tamarin. *Endangered Species UPDATE*, 8:82-85, 1990.
- LUQUETTI, A. D.; MILES, M.; RASSI, A.; REZENDE, J. M.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. M. & RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in Central Brasil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80:462-470, 1986.
- LUQUETTI, A.; PRATA, A.; MONCAYO, A.; ROMANHA, A.; JANSEN, A.; ZINGALES, B.; MOREL, C.; PONCE, C.; CHIARI, E.; CUPOLILLO, E.; GUHL, F.; MOMEN, H.; COURA, J. R.; STEINDEL, M.; MILES, M.; TIBAYRENC, M.; FERNANDES, O.; OLIVEIRA, R.; ZELEDÓN, R.; ANDRADE, S.; BARRET, T.; MACÊDO, V. & BRENER, Z. Recommendations from a satellite meeting. Simp. Int. sobre Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 anos após sua Descoberta. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl.1): 429-432, 1999.
- MILES M. A., TOYÉ, P. J.; OSWALD, S. C., GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71:217-225, 1977.
- NAIFF, R. D.; NAIFF, M. F.; BARRETT, T. V. & ARIAS, J. R. *Trypanosoma cruzi* nas glândulas anais do *Didelphis marsupialis*: primeiro registro de infecções naturais. *Anais do X Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia*, 1987. Resumo 165.
- NERY-GUIMARÃES, F.; da SILVA, N. N.; CLAISELL, D.; de MELLO, A. L.; RAPONE, T.; SNELL, T. & RODRIGUES, N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva ocorrido em Teutonia (Estrela-Rio Grande do Sul). *O Hospital*, 73:1767-1804, 1968.
- SOUTO, R.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A. & ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology* 83:141-152, 1996.
- STEINDEL, M.; SCHOLZ, A.; TOMA, H. K. & SCHLEMPER, B. R. Presence of *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of naturally infected opossum (*Didelphis marsupialis*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:513-515, 1988.

- STEVENS J.; NOYES, H. & GIBSON, W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93:669-676, 1998.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal of Parasitology* 28:85-104, 1995.
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, 42:277-292, 1988.
- VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal of Parasitology*, 24:1317-1331, 1994.
- ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPEBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A. M. & FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal of Parasitology* 28:105-112, 1998.