

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**MÉTODOS ESTATÍSTICOS NA AVALIAÇÃO DE
REAÇÕES CRUZADAS ENTRE *Leishmania* spp. E
Ehrlichia spp. POR MEIO DE TÉCNICAS
SOROLÓGICAS E MOLECULARES**

Walter Bertequini Nagata

Médico Veterinário

ARAÇATUBA - SP

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**MÉTODOS ESTATÍSTICOS NA AVALIAÇÃO DE
REAÇÕES CRUZADAS ENTRE *Leishmania* spp. E
Ehrlichia spp. POR MEIO DE TÉCNICAS
SOROLÓGICAS E MOLECULARES**

Walter Bertequini Nagata
Orientadora: Profa. Adj. Sílvia Helena Venturoli Perri
Coorientadora: Profa. Adj. Kátia Denise Saraiva Bresciani

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA - SP

2017

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

	Nagata, Walter Bertequini
N131m	<p>Métodos estatísticos na avaliação de reações cruzadas entre <i>Leishmania</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp. Por meio de técnicas sorológicas e moleculares / Walter Bertequini Nagata. Araçatuba: [s.n], 2017. 45f. il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2017</p> <p>Orientadora: Profª. Adjunto: Silvia Helena Venturoli Perri Coorientadora: Profª. Adjunto: Kátia Denise Saraiva Bresciani</p> <p>1. Medicina Veterinária Preventiva. 2. Bioestatística. 3. Leishmaniose. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. 5. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática 6. <i>Ehrlichia</i>. I. T.</p> <p>CDD 614.49</p>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: Métodos estatísticos na avaliação de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. por meio de técnicas sorológicas e moleculares

AUTOR: WALTER BERTEQUINI NAGATA

ORIENTADORA: SILVIA HELENA VENTUROLI PERRI

COORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL,
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp


Dra. SANDRA VALÉRIA INÁCIO
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP


Dra. MILENA ARAÚZ VIOL
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Araçatuba, 03 de janeiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Walter Bertequini Nagata - Birigui, 23 de março de 1990. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, no ano de 2014. Bolsista FAPESP de Iniciação Científica no período de 2011 a 2012 e 2013 a 2014.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

A toda minha Família, que com toda certeza, representa tudo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus por tudo em minha vida.

Aos meus queridos pais e irmã por toda educação, orientação, conselhos e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos e sempre lutar por eles.

À minha querida esposa por sempre estar ao meu lado, ajudando-me e apoiando-me em todos os momentos, incentivando-me a nunca desistir dos meus sonhos.

A toda minha família por toda torcida de sempre.

À minha orientadora, Sílvia Helena Venturoli Perri, que me orienta desde praticamente o início da graduação, ajudando-me, incentivando e dando conselhos para crescer como profissional e pessoa, sempre com muita atenção e respeito.

À minha coorientadora, Kátia Denise Saraiva Bresciani, por todos os conselhos e incentivos, sempre procurando ajudar a todos com muito respeito e atenção.

A Todos os meus amigos que torceram e me acompanharam durante este trajeto.

A todos os professores e amigos que me ajudaram a realizar e concluir esse trabalho, seja pelos conselhos, conhecimentos e auxílio em todas as partes do projeto de pesquisa.

A CAPES pelo financiamento dos primeiros meses de mestrado.

À FAPESP, pela confiança e financiamento (processos: 2011/12648-0, 2013/07329-8 e 2014/26413-2).

À Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba e todos seus funcionários pelo acolhimento e suporte.

À Isabel Pereira Matos pelas correções bibliográficas.

A todos os cães envolvidos no estudo, por toda sua contribuição.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
OBJETIVO.....	17
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS NA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS ENTRE <i>Leishmania</i> spp. E <i>Ehrlichia</i> spp. POR MEIO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES	26
Introdução.....	27
Material e Métodos	28
Resultados.....	31
Discussão	33
Conclusão.....	37
Referências	38

MÉTODOS ESTATÍSTICOS NA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS ENTRE *Leishmania* spp. E *Ehrlichia* spp. POR MEIO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi investigar, por métodos estatísticos, a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. com o uso de técnicas sorológicas e moleculares. Um total de 100 amostras sanguíneas de cães foram colhidas e processadas por meio do ELISA (Ensaio Imunoenzimático Indireto) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A análise estatística consistiu nos testes de McNemar e Coeficiente de concordância Kappa. As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A sensibilidade e especificidade dos testes foram determinadas pela curva ROC (Receiver Operator Characteristic), considerando o PCR como teste padrão ouro. A partir das análises pode-se verificar que 48,0% dos animais foram reativos na ELISA e 58,0% foram positivos na PCR, no caso da *Leishmania* spp. Para *Ehrlichia* spp., a ocorrência de anticorpos pelo ELISA foi de 54,0% e, pela PCR, 48,0% dos cães foram positivos. Nota-se, também, que 37,0% dos animais foram positivos para os dois patógenos por meio do teste molecular, e quatro cães foram reativos no teste ELISA para ambas as doenças e tiveram resultado negativo apenas no teste molecular de *Ehrlichia* spp. Estes resultados, na sorologia, podem sugerir possíveis casos de reatividade cruzada entre a *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp.. Entretanto, é mais provável que estes resultados estejam relacionados com a coinfeção desses agentes. Por meio dos resultados obtidos, há mais evidências de coinfeção por estes dois agentes patogênicos no cão, do que reatividade cruzada entre eles.

Palavras-chave: Bioestatística, Ehrlichia, Ensaio de imunoabsorção enzimática, Leishmaniose, Reação em cadeia da polimerase

STATISTICAL METHODS IN EVALUATION OF THE CROSS-REACTIONS BETWEEN *Leishmania* spp. AND *Ehrlichia* spp. BY SEROLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES

SUMMARY - The aim of this study is to investigate, by statistical methods, the occurrence of cross-reactivity between *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. using serological and molecular techniques. A total of 100 blood samples from dogs were collected and processed by ELISA (indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and PCR (polymerase chain reaction). Statistical analysis consists of McNemar tests and agreement coefficient Kappa. The statistics were considered significant when $p < 0.05$. The sensitivity and specificity of the tests were determined by ROC curve (Receiver Operator Characteristic), considering the PCR as gold standard. From the analysis it can be seen that 48,0% of the animals were reactive in ELISA and 58,0% were positive in PCR in the case of *Leishmania* spp. For *Ehrlichia* spp., the occurrence of antibodies by ELISA was 54,0% and, by PCR, 48,0% of the dogs were positive. It can be noted also that 37,0% of the animals were positive for both parasites through molecular test and four dogs were reactive in the ELISA test for both diseases and were negative only in molecular test for *Ehrlichia* spp. These results in serology can suggest possible cases of cross-reactivity between *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp.. However, it is more likely that these results are related to coinfection of these agents. Through the results obtained, there are more evidences of coinfection by these two pathogens in dogs than cross-reactivity between them.

Keywords: Ehrlichia, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Leishmaniasis, Polymerase Chain Reaction, Statistics

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em virtude do aumento na realização de pesquisas científicas no Brasil, nota-se uma mudança no perfil de pesquisador requisitado para esse tipo de trabalho. Em um processo gradual de transformação, a formação de muitos indivíduos tem se focado na especialização não só de uma única área em particular, mas em um conjunto de áreas que o ajude a construir e conduzir um planejamento experimental adequado (PFUETZENREITER; ZYLBERSZTAJN, 2008).

O conhecimento estatístico, sem dúvida, é instrumento essencial para a análise de dados de uma pesquisa, independente da área em que se trabalha, uma vez que saber utilizar os fundamentos estatísticos na metodologia científica torna a experimentação otimizada e mais confiável (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A interdisciplinaridade existente entre as áreas de exatas e biológicas tem demonstrado o quão importante é ocorrer esse tipo de relação entre essas disciplinas. A bioestatística contribui muito para o aprendizado dos graduandos e pós-graduandos. Seja em uma faculdade com assuntos ligados a biologia, ou a exatas, a bioestatística auxilia pesquisadores a encontrarem respostas às hipóteses formuladas em trabalhos científicos e projetos, pois é indispensável nessas produções e nas experimentações.

A metodologia científica é um processo realizado constantemente por vários pesquisadores com o intuito de verificar a veracidade de uma hipótese. Esse tipo de experimentação abre caminhos para o estudo e descobertas para soluções de problemas. Juntamente com esse processo, a intervenção da bioestatística é fundamental para a análise dos dados, permitindo assim a comprovação de um resultado experimental.

Em níveis gratificantes, nota-se que há um grande número de pesquisas na Medicina Veterinária. Estas são realizadas para analisar dados em várias áreas, como a parasitologia, imunologia, microbiologia, histologia, clínica médica e muitas outras.

Em consequência da grande proximidade e da forte interação do homem com os animais de companhia na atualidade (SANTOS et al., 2016), o estudo e a pesquisa de diversas enfermidades na clínica veterinária tem demonstrado crescimento e desenvolvimento bastante significativos.

A fim de buscar e de proporcionar melhores condições de saúde a esses pequenos animais que passaram a fazer parte de muitas famílias (CARVALHO; PESSANHA, 2013). A área da medicina veterinária está crescendo e se atualizando cada vez mais com aprimoramento de conhecimentos, por meio da formação de profissionais qualificados e pesquisas mais avançadas.

Entre as diversas enfermidades existentes na clínica veterinária de pequenos animais, em particular nos cães, pesquisas relacionadas a leishmaniose e a erliquiose tem se destacado na busca, não só de melhorias na sanidade, como também nas formas de prevenção, diagnóstico e tratamento. Devido à sua importância, o controle destas doenças é considerado não só desejável, como também uma obrigação para melhorar a qualidade de vida dos cães e do homem (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

Particularmente, as doenças transmitidas por vetores têm assumido papel importante tanto em saúde pública quanto animal (SOUSA et al., 2010). As transmitidas por carrapatos e flebótomos, em especial relacionadas aos animais de estimação como os cães, são consideradas temas de interesse crescente e mundial (LOPEZ et al., 2012).

A leishmaniose em humanos foi primeiramente diagnosticada, na Índia (LEISHMAN, 1903), e sinais como corpúsculos arredondados no baço foram descritos, posteriormente (DONOVAN, 1913). O primeiro caso da enfermidade no Brasil foi identificado na necropsia de um paciente de Mato Grosso do Sul (MIGONE, 1913).

Doença infecciosa que tem como agentes etiológicos parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*, como *Leishmania (Leishmania) donovani* na Ásia e África, *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas, tem afetado mais de 3000 pessoas, anualmente, só no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2012).

Protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (MONTEIRO et al., 2005) causam enfermidade de caráter zoonótico potencialmente fatal. Em níveis alarmantes, a Organização Mundial da Saúde a classifica como a segunda protozoose mais importante da atualidade. Na América Latina, essa enfermidade já foi descrita em vários países, sendo que 90% dos casos da forma visceral concentram-se no Brasil, especialmente na região nordeste (BRASIL, 2006).

Também conhecida por ser uma doença sistêmica crônica grave (ROATT et al., 2014), a leishmaniose visceral é transmitida por dois gêneros de flebotomos da família Phlebotominae: *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo (DUJARDIN et al., 2008; MAROLI et al., 2013). Também é importante ressaltar que as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* têm destaque importante na epidemiologia da doença no Brasil (BRASIL, 2006).

Esses vetores se infectam por meio da ingestão de formas amastigotas presentes nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), presentes na derme do hospedeiro infectado, durante o repasto sanguíneo; no tubo digestivo do flebotomo, transformam-se em promastigotas. Quando ocorre um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro onde são fagocitadas por macrófagos, tornando-se amastigotas. Posteriormente, ocorre replicação até o rompimento dessas células, permitindo a infecção de outros macrófagos. Assim, há disseminação hematogênica para tecidos, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea que são ricos em células do SFM, (LAINSON et al., 1987).

Particularmente, nota-se que os cães, por serem animais altamente suscetíveis à infecção por *Leishmania*, são considerados como principais fontes de infecção (reservatórios urbanos) da doença, por apresentarem intenso parasitismo, independente de sua apresentação clínica (GIUNCHETTI et al., 2006; LAURENTI et al., 2013).

Em cães, a leishmaniose pode se manifestar de maneira variável: assintomática ou sintomática. Enquanto alguns animais manifestam poucos

sintomas, como raras lesões cutâneas e nódulos, outros se apresentam caquéticos, com dermatopatias, nódulos e úlceras, que são frequentes nas bordas das orelhas, podendo ser encontradas espalhadas por todo o corpo. Casos de conjuntivite, blefarite, edema de focinho, onicogribose, paresia das patas posteriores e caquexia têm sido relatados. Nas fases adiantadas da doença ocorre esplenomegalia, linfadenopatias, diarreias e hemorragia intestinal (FEITOSA et al., 2000).

O Ministério da Saúde, por meio do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, estabeleceu várias medidas de controle da doença, como diagnóstico precoce, controle de vetores e identificação e eutanásia de cães soropositivos (BRASIL, 2006). No entanto, é importante ressaltar que a não utilização de condutas profiláticas, como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas em cães, acaba permitindo a manutenção da leishmaniose canina (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos como punção hepática, esplênica e o raspado cutâneo. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) começou a ser utilizada a partir de 1960. Com o desenvolvimento da PCR (reação em cadeia polimerase) é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do cinetoplasto do parasito sendo uma técnica mais específica e sensível (ALVES; BEVILACQUA, 2004). A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi* (VIOL et al., 2012).

Já o agente da erliquiose canina foi denominado como *Rickettsia canis* e inicialmente relatado em 1935, na Argélia, por Donatien e Lestoquard, que observaram organismos nas células mononucleares circulantes de cães infestados por carrapatos. Em 1945, em homenagem a Paul Ehrlich, esse organismo foi renomeado como *Ehrlichia canis* (ALMOSNY, 2002; SILVA et al., 2010).

O gênero *Ehrlichia* compreende cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. euttingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*; porém, destas espécies, a primeira delas

é a mais comum, considerada agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (DUMLER et al., 2001), capaz de causar quadro clínico mais severo e de maior importância epidemiológica (MACHADO, 2004), sendo esta a espécie descrita no Brasil (AGUIAR et al., 2013).

A Erliquiose é uma importante doença emergente zoonótica transmitida por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* ou marrom do cachorro (DANTAS-TORRES, 2008). Esta enfermidade apresenta elevada casuística em cães domésticos no Brasil (FARIA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011), com acentuada mortalidade (MUNHOZ et al., 2012), é considerada endêmica, com apresentação aguda, subaguda ou crônica (CASTRO et al., 2004), principalmente nas áreas onde há populações do carrapato vetor ixodídeo (MORAES-FILHO et al., 2012).

Em relação ao seu ciclo biológico, o carrapato supramencionado, no repasto sanguíneo, ingere leucócitos circulantes do hospedeiro contendo o agente etiológico da erliquiose (MURPHY et al., 1998). Esta bactéria se multiplica nos hemócitos, enterócitos e nas células das glândulas salivares do carrapato, nas quais existe transmissão transestadial (MONTEIRO, 2014).

A ocorrência de erliquiose canina não está associada ao sexo ou idade do animal e compromete o hospedeiro de várias maneiras diferentes, com diversos graus de severidade (NAKAGHI et al., 2008). Sinais clínicos, como trombocitopenia e anemia são as anormalidades mais comuns encontradas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados (M'GHIRBI et al., 2009).

O diagnóstico dessa infecção é importante, devido ao fato da erliquiose ser uma zoonose emergente. Desta forma, quanto mais precoce for a detecção do agente, haverá mais condições de se realizar um tratamento adequado da doença e, portanto, favorecer um melhor resultado (MUNHOZ et al., 2012).

O esfregaço de sangue é a técnica mais utilizada na clínica para identificar mórulas em leucócitos e plaquetas. No entanto, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade, este exame deve ser complementado com o auxílio de técnicas moleculares, como PCR (DAGNONE et al., 2009; RAMOS

et al., 2010), cultivo e sorologia (BEALL et al., 2012; ROTONDANO et al., 2012).

Devido aos índices altos de morbidade e mortalidade que essas parasitoses têm apresentado e à variedade de agentes patogênicos que um carrapato pode veicular a pequenos animais, como *Babesia canis*, *B. gibsoni*, *E. canis* e *Rickettsia* spp. (O'DWYER, 2011; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011), percebe-se que as mesmas são de grande relevância para o estudo médico veterinário (WITTER et al., 2013).

A erliquiose é uma hemoparasitose muito encontrada na clínica de pequenos animais e que provoca graves sintomas, podendo levar o animal à morte. Por sua vez, a leishmaniose é uma zoonose de grande importância e impacto na Saúde Pública, e os cães desempenham papel importante na epidemiologia desta antropozoonose como reservatórios de tripanossomatídeos.

Particularmente, há várias maneiras de diagnosticar estas duas doenças nas clínicas veterinárias. As técnicas sorológicas, por exemplo, consistem em métodos diagnósticos rápidos e confiáveis (TÁVORA et al., 2007), no entanto, apesar de apresentarem estas características e terem bons níveis de sensibilidade e especificidade, podem apresentar reatividade cruzada (FERRER et al., 1995). Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, como a PCR, que é mais específica e sensível, é possível identificar o DNA dos patógenos *Ehrlichia* spp. (NAKAGHI et al., 2008) e *Leishmania* spp. (PAIVA CAVALCANTI et al., 2009), permitindo um diagnóstico mais preciso.

Tanto a leishmaniose quanto a erliquiose são responsáveis pela ocorrência de muitos sinais clínicos similares e inespecíficos no cão, como febre, apatia, anorexia, perda de peso e anemia (ALMOSNY, 2002; MACHADO et al., 2007; NAKAGHI et al., 2008). Isso torna mais difícil a sua distinção e detecção (BLAVIER et al., 2001) e, conseqüentemente, exige o uso de técnicas de diagnóstico adequadas para a sua identificação.

A determinação da ocorrência de caninos como fontes de infecção para essas enfermidades, pela investigação de um diagnóstico seguro, representado

pelas técnicas de ELISA e PCR, contribuirá para a vigilância epidemiológica e, conseqüentemente, para a execução de medidas de controle mais eficientes nestas regiões. Além disso, a comparação entre as duas técnicas diagnósticas possibilitará um melhor conhecimento sobre a eficácia das mesmas na investigação destas doenças.

Evidências a respeito da existência de reatividade cruzada entre estes patógenos pela população científica são discutidos, visto que há elevada ocorrência dessas doenças no Brasil, onde se encontram disseminadas, configurando enfermidades reemergentes no Estado de São Paulo.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar, por métodos estatísticos, a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. com o uso de técnicas sorológicas e moleculares.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; PACHECO, T. A.; MENESES, A. M. C.; ZANUTTO, M. S.; HORTA, M. C.; SANTAREM, V. A.; CAMARGO, L. M. A.; MCBRIDE, J. W.; LABRUNA, M. B. Genetic diversity of Ehrlichia canis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 315–321, 2013.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002, 135p.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

BEALL, M. J.; ALLEMAN, A. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; COHN, L. A.; COUTO, C. G.; DRYDEN, M. W.; GUPTILL, L. C.; IAZBIK, C.; KANIA, S. A.; LATHAN, P.; LITTLE, S. E.; ROY, A.; SAYLER, K. A.; STILLMAN, B. A.; WELLES, E. G.; WOLFSON, W.; YABSLEY, M. J. Seroprevalence of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia ewingii in dogs in North America. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 29, p. 1-11, 2012.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108- 120, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: MS., 2006.

CARVALHO, R.L.S.; PESSANHA, L.D.R. Relação entre famílias, animais de estimação, afetividade e consumo: estudo realizado em bairros do Rio de Janeiro. **Sociais e Humanas**, v. 26, n. 3, p. 622-637, 2013.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 73–86, 2004.

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 25, p.1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol**, v. 28, p. 531–538, 2012.

DONOVAN, C. Memoranda: on the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 6, p. 118-120, 1913.

DUJARDIN, J.C.; CAMPINO, L.; CANAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; SOTERIADOU, K.; MAZERIS, A.; OZBEL, Y.; BOELAERT, M. Spread of vector borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1013–1018, 2008.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.

FARIA, J. L. M.; DAGNONE, A. S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis morulae* and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Revista Clínica Veterinária**, n. 28, p. 36-44, 2000.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100–107, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 517, 1987.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 296–300, 2013.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2213, p. 1252–1254, 1903.

LOPEZ, J.; ABARCA, K.; MUNDACA, M. I.; CABALLERO, C.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F. Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un caninote de la ciudad de Arica, Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 5, p. 527–530, 2012.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatología da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 50-58, 2007.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 53-57, 2004.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; G R ADONI, L. Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, p. 123–147, 2013.

M'GHIRBI, Y.; GHORBEL, A.; AMOURI, M.; NEBAOUI, A.; HADDAD, S.; BOUATTOUR, A. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitology Research**, v. 104, p. 767–774, 2009.

MIGONE, LE. Um caso de kalazar a Assuncion (Paraguai). **Bulletin Society Pathology Exotic**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. D. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MONTEIRO, S.G; **Parasitologia na medicina veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap. 17, p. 173 – 175.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.;MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Experimental *Ehrlichia canis* infectionchanges acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 206-212, 2012.

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Experimental *Ehrlichia canis* infectionchanges acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 206-212, 2012.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serological survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 325-339, 1998.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

O'DWYER, L. H. Brazilian canine hepatozoonosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 181-193, 2011.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339-345, 2013.

PAIVA CAVALCANTI, M.; BRITO M. E. F.; DE SOUZA, W. V.; GOMES, Y. G.; ABATH, F. G. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, n.2, p. 356-358, 2009.

PFUETZENREITER, M. R.; ZYLBERSZTAJN, A. Percepções de estudantes, professores e médicos veterinários sobre o ensino da Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública. **Revista de Ciências Agroveterinárias Lages**, v. 7, n. 1, p. 75-84, 2008.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, p. 1115–1120, 2010.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; COURA-VITAL, E.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral

leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 272, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª Ed. Campinas – SP: Cárita Editora, 2009.

ROTONDANO, T. E. F.; ALMEIDA, A. M. P.; LUSTOSA, E. M. C.; CORDEIRO, A. A.; CAMBOIM, E. K. A.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **The Scientific World Journal**, 2012.

SANTOS, R. C. B.; MOURA, K. B.; SOUSA, E. S.; OLIVEIRA, R. A.; SOARES, B. C.; MELO, W. O. Interação homem-animal de companhia no município de Paragominas, sudeste do Pará. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 55-62, 2016.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 48– 60, 2011.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 482-483, 2007.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

VIOL, M. A.; LIMA, V. M. F.; AQUINO, M. C. C.; GALLO, G.; ALVES, I. P.; GENEROSO, D.; PERRI, S. H. V.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; NUNES, C. M.; BRESCIANI, K. D. S. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1607–1613, 2012.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3811-3822, 2013.

CAPÍTULO 2 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS NA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS ENTRE *Leishmania* spp. E *Ehrlichia* spp. POR MEIO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi investigar, por métodos estatísticos, a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. com o uso de técnicas sorológicas e moleculares. Um total de 100 amostras sanguíneas de cães foram colhidas e processadas por meio do ELISA (Ensaio Imunoenzimático Indireto) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A análise estatística consistiu nos testes de McNemar e Coeficiente de concordância Kappa. As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A sensibilidade e especificidade dos testes foram determinadas pela curva ROC (Receiver Operator Characteristic), considerando o PCR como teste padrão ouro. A partir das análises pode-se verificar que 48,0% dos animais foram reativos na ELISA e 58,0% foram positivos na PCR, no caso da *Leishmania* spp. Para *Ehrlichia* spp., a ocorrência de anticorpos pelo ELISA foi de 54,0% e, pela PCR, 48,0% dos cães foram positivos. Nota-se também que 37,0% dos animais foram positivos para os dois patógenos por meio do teste molecular e quatro cães foram reativos no teste ELISA para ambas as doenças e tiveram resultado negativo apenas no teste molecular de *Ehrlichia* spp. Estes resultados na sorologia podem sugerir possíveis casos de reatividade cruzada entre a *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp.. Entretanto, é mais provável que estes resultados estejam relacionados com a coinfeção desses agentes. Por meio dos resultados obtidos, há mais evidências de coinfeção por estes dois agentes patogênicos no cão do que reatividade cruzada entre eles.

Palavras-chave: Bioestatística, Ehrlichia, Ensaio de imunoabsorção enzimática, Leishmaniose, Medicina Veterinária Preventiva, Reação em cadeia da polimerase

Introdução

Entre as diversas enfermidades existentes na clínica veterinária de pequenos animais, em particular nos cães, pesquisas relacionadas à leishmaniose e a erliquiose têm se destacado na busca não só de melhorias na sanidade, como também na prevenção, diagnóstico e tratamento. Devido a sua importância, o controle destas doenças é considerado não só desejável, como também uma obrigação para a melhoria da qualidade de vida dos cães e da saúde humana (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

Particularmente, as doenças transmitidas por vetores têm assumido papel importante tanto em saúde pública quanto animal (SOUSA et al., 2010). As transmitidas por carrapatos e flebótomos, em especial as relacionadas aos animais de estimação como os cães, são consideradas temas de interesse crescente e mundial (LOPEZ et al., 2012).

A leishmaniose é uma doença infecciosa que tem como agente etiológico protozoários intracelulares da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas (DANTAS-TORRES et al., 2012). Ela é transmitida por dois gêneros de flebótomos da família Phlebotominae: o *Lutzomyia* nas Américas e o *Phlebotomus* no Velho Mundo (MAROLI, 2013), sendo que as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* têm destaque importante na epidemiologia da doença (BRASIL, 2006). É importante ressaltar que ela também é conhecida por ser uma doença sistêmica crônica grave (ROATT, 2014).

A Erliquiose é uma importante doença zoonótica transmitida por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* ou marrom do cachorro (DANTAS-TORRES, 2008). É uma doença causada por bactérias intracelulares obrigatórias (NAKAGHI et al., 2008) como a *Ehrlichia canis*, considerada endêmica e podendo ter apresentação aguda, subaguda ou crônica (CASTRO et al., 2004). É uma enfermidade com alta casuística em cães domésticos no Brasil (VIEIRA et al., 2011) e que apresenta acentuada mortalidade (MUNHOZ et al., 2012).

Técnicas sorológicas consistem em métodos diagnósticos rápidos e confiáveis (TÁVORA et al., 2007), no entanto, apesar de seus bons níveis de sensibilidade e especificidade, podem apresentar reatividade cruzada (FERRER et al., 1995). Com o desenvolvimento da PCR (reação em cadeia polimerase), técnica mais específica e sensível, é possível identificar o DNA dos patógenos *Ehrlichia* spp. (NAKAGHI et al., 2008) e *Leishmania* spp. (ALVES; BEVILACQUA, 2004; PAIVA CAVALCANTI et al., 2009).

A investigação da ocorrência destas enfermidades pelas técnicas de ELISA e PCR, pode contribuir em termos de vigilância epidemiológica e conseqüentemente para a adoção de medidas de controle mais eficientes. Além disso, a comparação entre as duas técnicas diagnósticas possibilita um melhor conhecimento sobre a eficácia das mesmas na investigação destas doenças. Evidências a respeito da existência de reatividade cruzada entre estes patógenos pela população científica são discutidos, visto que há elevada ocorrência dessas doenças no Brasil, onde se encontram disseminadas, configurando enfermidades reemergentes no Estado de São Paulo.

O objetivo do presente estudo foi investigar, por métodos estatísticos, a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. com o uso de técnicas sorológicas e moleculares.

Material e Métodos

Comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) UNESP, Campus de Araçatuba, processo FOA n° 00856-2015.

População de estudo

A amostragem mínima necessária para a execução deste projeto, no nível de confiança de 95% e com precisão absoluta de 10%, foi calculada em 96 amostras, usando uma proporção populacional de 50% (LWANGA;

LEMESHOW, 1991). Neste trabalho, um total de 100 amostras de cães domiciliados, provenientes do Município de Araçatuba (SP), 55 machos e 45 fêmeas, 28 de raça definida (RD) e 72 sem raça definida (SRD), foram colhidas aleatoriamente. Em relação às faixas etárias, foram considerados jovens, adultos e idosos, de seis a 12, de 13 a 84 e acima de 85 meses, respectivamente.

Colheita de sangue

Cinco a oito mililitros de sangue foram colhidos, por meio de punção venojugular. As amostras foram armazenadas e divididas em dois tubos, um contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e outro sem anticoagulante, e foram mantidas sob congelamento até o momento de seu processamento.

Extração de DNA

A purificação de DNA do sangue periférico dos cães foi realizada após digestão com proteinase K (0,5 µg), extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol (SAMBROOK et al., 1989).

Caracterização molecular

1. PCR para *Leishmania* spp.

A região conservada de kinetoplasto de *Leishmania* spp. de 120pb foi amplificada, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 13A (5' GTGGGGGAGGGGCGTTCT 3') e 13B (5' ATTTTACACCAACCCCCAGTT 3') descrito por Rodgers et al. (1990).

A amplificação foi realizada em volume de 25 µL contendo 20 nanogramas de DNA genômico, 1,5mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 0,2mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq polimerase platinum (Invitrogen®). As amostras foram amplificadas, usando-se o aparelho termociclador (MJ Research Thermal cycler®); neste, as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos

de desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido por 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, realizada em voltagem constante (100 v) por período de três horas. Após a corrida, o gel foi corado com solução de nitrato de prata. Em todas as reações foram incluídos controle positivo (amostra de DNA de cão com diagnóstico sorológico positivo) e controle negativo (DNA de cão com diagnóstico sorológico negativo).

2. PCR para *Ehrlichia canis*

Para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 16S do rRNA foi utilizada a técnica de nested-PCR com os primers 5'-GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' e 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' para a reação primária (pb 478) e 5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' e 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' para a reação secundária (pb 358) (MURPHY et al., 1998). Foram utilizadas as seguintes condições de reação: preparação de 20µl de solução contendo 2,5 µl de tampão para PCR 10 x, 0,75 mM MgCl₂, 0,125 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 0,2 µM de desoxiribonucleotídeo (dNTPs), 1,0 µl de cada oligonucleotídeo (primer) e 5 µl de DNA alvo contendo 20 nanogramas de DNA genômico. Estes iniciadores eram complementares ao gene de rRNA 16S de *E. canis*. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 1 minuto a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 60 °C, 1 minuto de extensão a 72 °C, com extensão final a 72 °C por 5 minutos. A única modificação da reação primária para a secundária foi a temperatura de anelamento que ocorrerá durante 1 minuto a 55 °C. Foram utilizados como controles positivo e negativo DNA de *E. canis* e água ultra-pura, respectivamente. Os produtos da PCR e um marcador de peso molecular (escala de 100 pb) foram submetidos à

eletroforese por meio de um gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (MURPHY et al., 1998).

Sorologia

3. ELISA para *Leishmania* spp.

As amostras de soro foram analisadas para os anticorpos de *L. chagasi*, utilizando um kit Imunoteste® Leishmania (ELISA) – Canino (Imunodot diagnósticos®), em conformidade com as instruções do fabricante.

4. ELISA para *Ehrlichia* spp.

As amostras de soro foram analisadas para os anticorpos de *E. canis*, utilizando um kit Imunoteste® Ehrlichia (ELISA) – Canino (Imunodot diagnósticos®), em conformidade com as instruções do fabricante.

Interpretação dos resultados do ELISA

O ponto de corte “cut off” e os valores da sensibilidade e especificidade dos testes foram determinados por meio do programa computacional GraphPad Prisma 6.0, pela curva ROC (Receiver Operator Characteristic), considerando o PCR como teste padrão-ouro.

Estatística

A análise estatística consistiu no teste de McNemar para comparar a proporção de resultados positivos das duas técnicas e coeficiente de concordância Kappa. As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O banco de dados foi criado com o Microsoft Office Excel 2010, e as análises estatísticas foram efetuadas com o programa computacional SAS® (Statistical Analysis System) versão 9.3.

Resultados

Por meio da curva ROC, o ponto de corte do teste sorológico para *Leishmania* spp. foi 0,2740, com sensibilidade de 72,4% e especificidade de

85,7%. Para *Ehrlichia* spp., o ponto de corte foi de 0,3805, com sensibilidade de 83,3% e especificidade de 73,1%.

Em relação à *Leishmania* spp., pelo ELISA, 48,0% dos animais foram reativos. Pela PCR, 58,0% apresentaram amplificação do DNA de *Leishmania* spp.. Para *Ehrlichia* spp., a ocorrência de anticorpos pelo ELISA, foi de 54,0% e pela PCR, 48,0% dos cães foram positivos. A partir dos resultados, nota-se que 35,0% e 37,0% dos animais foram reativos e positivos para os dois agentes patogênicos por meio do teste sorológico e molecular, respectivamente.

Do total de animais, 12,0% foram sorologicamente reativos para *Leishmania* spp. e/ou *Ehrlichia* spp. e negativos na PCR para ambos patógenos. Quatro cães foram reativos no teste ELISA para ambas as doenças e tiveram resultado negativo apenas no teste molecular de *Ehrlichia* spp..

Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se os resultados referentes à reatividade/positividade e negatividade para *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. por meio da técnica sorológica utilizada, em comparação ao método molecular. A proporção de resultados positivos entre as técnicas de diagnóstico ELISA e PCR, tanto para *Leishmania* spp. quanto para *Ehrlichia* spp. não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Positividade e negatividade da infecção por *Leishmania* spp. pelo ELISA em relação a PCR, em cães no município de Araçatuba, São Paulo.

ELISA	PCR				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
	N	%	N	%		
Positivo	42	42,0	6	6,0	48	48,0
Negativo	16	16,0	36	36,0	52	52,0
Total	58	58,0	42	42,0	100	100,0

Teste de McNemar ($p = 0,0550$)

Tabela 2 - Positividade e negatividade da infecção por *Ehrlichia* spp. pelo ELISA em relação a PCR, em cães no município de Araçatuba, São Paulo.

ELISA	PCR				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
	N	%	N	%		
Positivo	40	40,0	14	14,0	54	54,0
Negativo	8	8,0	38	38,0	46	46,0
Total	48	48,0	52	52,0	100	100,0

Teste de McNemar ($p = 0,2864$)

Em relação à concordância das provas sorológicas para *Leishmania* spp. e para *Ehrlichia* spp., quando comparado ao PCR, o coeficiente Kappa foi de 0,5628 e 0,5614, respectivamente.

Discussão

No presente estudo, foram detectados quatro cães reativos no ELISA para ambas as doenças, mas que apresentavam positividade apenas na PCR de *Leishmania* spp.. Estes resultados na sorologia podem sugerir a possibilidade de reatividade cruzada entre a *Leishmania* spp. e a *Ehrlichia* spp.. Entretanto, é mais provável que estes resultados estejam relacionados com a coinfeção desses agentes.

Tanto a leishmaniose quanto a erliquiose são responsáveis pela ocorrência de muitos sinais clínicos similares e inespecíficos no cão: febre, apatia, anorexia, perda de peso e anemia (ALMOSNY, 2002; MACHADO et al., 2007; NAKAGHI et al., 2008). Isso torna mais difícil a sua distinção e detecção (BLAVIER et al., 2001) e, conseqüentemente, exige o uso de técnicas de diagnóstico adequadas para a sua identificação.

No entanto, quando se fala de teste sorológico, que é um teste recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, deve-se ressaltar que apesar de ter bom nível de sensibilidade e especificidade, pode apresentar casos de falso-positivos por causa de reatividade cruzada (FERRER et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2008).

Devido à semelhança filogenética entre os protozoários *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., já foram relatados casos de reatividade cruzada entre estes patógenos na sorologia (LUCIANO et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2008; VIOL et al., 2012). Em contrapartida, outras pesquisas dizem que podem ocorrer reações cruzadas com outros microrganismos diferentes, como *Babesia canis* (ALVAR et al., 2004) e *Ehrlichia canis* (ZANETTE et al., 2013), produzindo resultados falso-positivos.

Enquanto há autores que afirmam ter encontrado reatividade cruzada na sorologia entre a *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. em seus estudos (FERREIRA EDE et al., 2007; ZANETTE et al., 2013), existem pesquisas que relatam a não existência de reatividade cruzada, e sim casos de coinfeção desses parasitos no mesmo cão (KRAWCZAK et al., 2015), especialmente em áreas endêmicas (OLIVEIRA et al., 2008).

Neste trabalho, o teste sorológico para *Ehrlichia* spp. detectou maior número de cães reativos do que positivos no teste molecular, podendo sugerir a ocorrência de reações cruzadas no ELISA. No entanto, o fato dos cães serem soropositivos e negativos na PCR, pode sugerir que estes animais estejam na fase crônica da doença ou que foram previamente expostos a esta bactéria (SOUSA et al., 2013). Geralmente, a PCR permite a detecção de *Ehrlichia* spp. na fase aguda da doença nos cães, enquanto os testes sorológicos permitem sua detecção nas fases subclínica, crônica e em animais em recuperação (RENÉ-MARTELLET et al., 2015).

Particularmente, pelo estudo ocorrer em uma área endêmica para as duas doenças, isso implicaria na inclusão destes patógenos nos diagnósticos diferenciais um do outro, já que os animais estão expostos a esses agentes transmitidos por flebotomíneos e carraças. É importante também, sempre que possível, utilizar, concomitantemente, técnicas de diagnósticos mais precisas, como a PCR, a fim de se evitar falso-positivos.

No caso desta pesquisa, por exemplo, a adoção do teste sorológico para verificar a reatividade no soro desses quatro animais à *Ehrlichia* spp. e a não pesquisa de *Leishmania* spp. por ELISA e/ou PCR, poderia contribuir para a

perpetuação da leishmaniose na cidade, já que os animais permaneceriam, sem as adequadas medidas de controle e prevenção no local estudado, que é uma região endêmica.

Com os resultados, pode-se notar que 12 cães foram sorologicamente positivos para *Leishmania* spp. e/ou *Ehrlichia* spp. e negativos pela PCR para os dois agentes. Apesar do material colhido para a extração do DNA e análise das amostras não apresentar implicações negativas no caso dos testes para *Ehrlichia* spp. (BANETH et al., 2009; FARIA et al., 2010), deve-se salientar que o sangue, no caso da *Leishmania* spp., pode demonstrar menores índices parasitêmicos em animais infectados e ter inibidores de PCR que interferem na sensibilidade desta referida técnica (REITHINGER et al., 2002). Porém, é importante lembrar que o método de colheita dessas amostras é prático e menos invasivo (MANNA et al., 2004; NUNES et al., 2007) e frequentemente utilizado nas clínicas.

Neste trabalho, foi constatado que mais de um terço dos animais analisados apresentavam reatividade na técnica sorológica (35,0%) e positividade na molecular (37,0%) para os dois patógenos. Em relação ao teste padrão ouro, que neste caso é a PCR, nota-se que uma fração considerável de cães estavam infectados tanto com *Leishmania* spp., quanto com *Ehrlichia* spp., o que caracterizava uma coinfeção por estes agentes.

Vários estudos encontraram resultados similares a desta pesquisa científica: Sousa e Almeida (2008), a partir da análise sorológica e parasitológica de cães, encontraram animais que possivelmente evidenciavam coinfeção entre estes parasitos; Mekuzas et al. (2009), por meio de teste sorológico e molecular, detectaram coinfeção nos animais de seu estudo; e Gonçalves et al. (2014), por meio da PCR, também encontraram este mesmo resultado.

Em níveis alarmantes, nota-se que há muitas doenças caninas transmitidas por vetores, como leishmaniose por flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*) e erliquiose por carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*). Verifica-se que muitos destes agentes, além de representarem um grande problema para

a saúde animal, também têm importantes implicações na saúde pública, pois alguns destes patógenos apresentam elevado potencial zoonótico (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014; MAIA et al., 2015).

No caso dos carrapatos, como o *R. sanguineus*, que configura vetor comum da *Babesia vogeli*, *E. canis* e *Anaplasma platys*, é comum ocorrer coinfeções (NAKAGHI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008), pois ele pode transmitir esses três agentes ao cão (DANTAS-TORRES, 2008).

A existência de animais infectados com mais de um patógeno ocorre frequentemente, pois existe abundância de vetores hematófagos que podem se hospedar nos cães, infectando-os com muitos agentes simultaneamente (MEKUZAS et al., 2013). É importante ressaltar que se deve dar muita atenção a esse tipo de ocorrência, pois estes parasitos podem influenciar um ao outro, causando uma variedade de interações na resposta imunológica do animal (ANDRADE et al., 2014).

No caso das doenças causadas pela *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp., dois patógenos intracelulares obrigatórios, que se replicam dentro de fagócitos mononucleares, a coinfeção por eles pode comprometer severamente a saúde dos animais (ANDRADE et al., 2014).

Em estudos anteriores, podem-se constatar relatos sobre a imunossupressão causada pela leishmaniose, que pode promover a coinfeção por outros agentes como *Ehrlichia* spp. (FEITOSA et al., 2000; PAULAN et al., 2013) assim como pesquisa propondo que a erliquiose canina pode ser um fator que contribui para o estabelecimento da leishmaniose (MEKUZAS et al., 2009).

O conhecimento destes casos é essencial para que se dê a devida atenção aos testes de diagnósticos empregados, procurando sempre levar em consideração que mais de um agente pode causar doenças concomitantes nos animais, a fim de se determinarem as condutas adequadas para cada caso.

Ao se comparar a proporção de resultados positivos entre as duas técnicas de diagnóstico estudadas, por meio do teste de McNemar, pode-se notar que as técnicas não apresentam diferença significativa entre si ($p < 0,05$),

em vista que as sensibilidades das técnicas sorológicas de *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. em relação a técnica molecular apresentaram níveis de 72,4% e 83,3%, respectivamente.

Os testes de ELISA para *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. apresentaram regular concordância com os resultados da PCR, de acordo com os critérios sugeridos por Pereira (2001).

Desta forma, embora no caso da *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. a ocorrência de coinfeção seja mais provável do que a reatividade cruzada, na avaliação de um animal suspeito de infecção, deve-se atentar para estas duas situações, de modo a adotar as condutas necessárias para cada caso.

Conclusão

Por meio dos resultados obtidos, há mais evidências de coinfeção por estes dois agentes patogênicos no cão do que reatividade cruzada entre eles.

Referências

- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: NDL. F. Livros, 2002.
- ALVAR, J.; CANAVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ANDRADE, G. B.; BARRETO, W. T. G.; SANTOS, L. L.; RIBEIRO, L. R. R.; MACEDO, G. C.; SOUSA, K. C. M.; ANDRE, M. R.; MACHADO, R. Z.; HERRERA, H. M. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 509-515, 2014.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 321-325, 2009.
- BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª ed. Brasília: MS., 2006.
- CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis:

clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 73–86, 2004.

DANTAS-TORRES F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 22, p. 1-25, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**. v. 28, p. 531–538, 2012.

FARIA, J. L. M.; DAGNONE, A. S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Ehrlichia canis morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FERREIRA EDE, C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; ESCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 235-241, 2007.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

GRAPHPAD Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

GONÇALVES, L. R.; FILGUEIRA, K. D.; AHID, S. M. M.; PEREIRA, J. S.; VALE, A. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014.

KRAWCZAK, F. S.; REIS, I. A.; SILVEIRA, J. A.; AVELAR, D. M.; MARCELINO, A. P.; WERNECK, G. L.; LABRUNA, M. B.; PAZ, G. F. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64-68, 2015.

LOPEZ, J.; ABARCA, K.; MUNDACA, M. I.; CABALLERO, C.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F. Identificación molecular de Ehrlichia canis en un caninodé la ciudad de Arica, Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 5, p. 527-530, 2012.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de Leishmania spp e Trypanosoma cruzi na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.

LWANGA, S.K.; LEMESHOW, S. **Sample size determination in health studies: a practical manual**. Geneva: World Health Organization, 1991. 80 p.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 50-58, 2007.

MAIA, C.; ALMEIDA, B.; COIMBRA, M.; FERNANDES, M. C.; CRISTÓVÃO, J. M.; RAMOS, C.; MARTINS, A.; MARTINHO, F.; SILVA, P.; NEVES, N.; NUNES, M.; VIEIRA, M. L.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 138, p. 1-7, 2015.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRIONGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251-262, 2004.

MAROLI, M.; FELICIANI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, p. 123–147, 2013.

MEKUZAS, Y.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; FOGLIA MANZILLO, V.; BANETH, G. Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. S2, Suppl2, p. 30-31, 2009.

MEKUZAS, Y.; JAFFE, C. L.; PASTOR, J.; CARDOSO, L.; BANETH, G. Identification of Babesia species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 367-373, 2013.

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Experimental Ehrlichia canis infection changes acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 206-212, 2012.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serological survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 325-339, 1998.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NUNES, C. M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B.; AZEVEDO, M.A. A.; LIMA, V.F.M.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, T. M.; FURUTA, P. I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339-345, 2013.

PAIVA CAVALCANTI, M.; BRITO M. E. F.; DE SOUZA, W. V.; GOMES, Y. G.; ABATH, F. G. The development of a real-time PCR assay for the quantification

of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, n.2, p. 356-358, 2009.

PAULAN, S. C.; LINS, A. G. S.; TENÓRIO, M. S.; SILVA, D. T.; PENA, H. F. J.; MACHADO, R. Z.; GENNARI, S. M.; BUZETTI, W. A. S. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 162-166, 2013.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 596p.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

RENÉ-MARTELLET, M.; LEBERT, I.; CHÊNE, J.; MASSOT, R.; LEON, M.; LEAL, A.; BADAVELLI, S.; CHALVET-MONFRAY, K.; DUCROT, C.; ABRIAL, D.; CHABANNE, L.; HALOS, L. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 3, p. 1-10, 2015.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; COURA-VITAL, E.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.272, 2014.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary: NC, 2016.

SOUSA, K. C. M.; ANDRÉ, M. R.; HERRERA, H. M.; ANDRADE, G. B.; JUSI, M. M. G.; SANTOS, L. L.; BARRETO, W. T. G.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, G. P. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for Leishmania infantum in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 525-531, 2013.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F. Co-infection between visceral leishmaniasis and monocytic ehrlichiosis in dogs from Cuiabá, Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 2, p. 113-117, 2008.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar Leishmania sp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 482-483, 2007.

TRONCARELLI, M. Z.; MACHADO, J. G.; CAMARGO, L. B.; HOFFMANN, J. L.; CAMOSSI, L.; GRECA, H.; FACCIOLI, P. Y.; LANGONI, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 40–47, 2008.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

VIOL, M. A.; LIMA, V. M. F.; AQUINO, M. C. C.; GALLO, G.; ALVES, I. P.; GENEROSO, D.; PERRI, S. H. V.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; NUNES, C. M.; BRESCIANI, K. D. S. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1607–1613, 2012.

ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64-68, 2013.