UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

TRANSTORNOS REPRODUTIVOS CAUSADOS POR AGENTES INFECCIOSOS EM ANIMAIS DE CANIS COMERCIAIS DA MICROREGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, ESTADO DE SÃO PAULO

Denise Claudia Tavares
Médica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

TRANSTORNOS REPRODUTIVOS CAUSADOS POR AGENTES INFECCIOSOS EM ANIMAIS DE CANIS COMERCIAIS DA MICROREGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, ESTADO DE SÃO PAULO

Denise Claudia Tavares

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal.

2015

Tavares, Denise Claudia

T231t Transtornos reprodutivos causados por agentes infecciosos em animais de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. / Denise Claudia Tavares. – – Jaboticabal, 2015

xiii, 75 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Gilson Hélio Toniollo

Coorientadora: Fabiana Ferreira de Souza

Banca examinadora: Katia Denise Saraiva Bresciani, Leandro Luís Martins, Maria Isabel Mello Martins, Valeska Rodrigues

Bibliografia

1. Cães. 2. Doenças infecciosas. 3. Abortamento. 4. Reprodução. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:561.24:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Certificado de Aprovação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Denise Claudia Tavares, nascida em 05 de Dezembro de 1969 na cidade de Ribeirão Preto. Iniciou o curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário Moura Lacerda em Ribeirão Preto em Março de 1998 concluindo em Dezembro de 2002, com registro no conselho de classe CRMV-SP 16.526. Em Dezembro de 2004 concluiu o curso de especialização em Homeopatia Veterinária pelo Instituto Homeopático François Lamasson (Ribeirão Preto) e em 2006 finalizou o curso de Especialização em Clínica Médica "Latu Sensu" pela Universidade Castelo Branco (Rio de Janeiro) com Trabalho de Conclusão de Curso intitulada: "Hiperplasia da glândula da terceira pálpebra em cães domésticos". Em Março de 2009, iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no Programa de Cirurgia Veterinária sob a Orientação do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, concluindo-o em Fevereiro de 2011 com a dissertação: "Curva de aprendizado da ovariohisterectomia vídeo-assistida e da miniceliotomia associada à técnica do gancho de Snook em gatas (*Felis catus*, Linnaeus, 1758)". No mesmo, ano iniciou o curso de Doutorado no Programa de Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal. Durante esse período participou de diversos congressos e atividades, as quais geraram algumas publicações, assim como ministrou algumas aulas e palestras.

“Comovo-me em

excesso, por natureza,

e por ofício, acho

medonho alguém

viver sem paixões.”

Graciliano Ramos

DEDICATÓRIA

Oh meu avô...

Quão cheio de orgulho estaria você nesse momento...

Quantas lutas e quantas vitórias passaste em meu favor...

De tudo sou infinitamente grata!

E meu amor do tamanho do universo, só aumenta junto com a saudade...

Eis aqui! toda sua...

Te amo! Até um dia...

AGRADECIMENTOS

“Ser grato é reconhecer que a vida - embora flua em um movimento incessante - é completa em si mesma a cada momento...”

Agradeço inicialmente ao Prof. Dr. **Gilson Hélio Toniollo**, meu orientador, por toda dedicação, pelo profissionalismo, pelos puxões de orelha, pelas risadas, pela educação, respeito, competência, capacidade, disponibilidade, etc, etc e etc... principalmente por ter sido meu ORIENTADOR;

Agradeço a Prof. Dra. **Fabiana Ferreira de Souza**, minha coorientadora mais que especial, minha amiga, mãe, filha, irmã, companheira, professora, orientadora e acima de tudo, meu exemplo de PROFISSIONALISMO, ética, educação, elegância... Só Você sabe o que representa em minha vida... Te amo do tamanho do Universo;

A minha família, minha avó **Emília**, que se sacrificou tanto para que esse objetivo fosse alcançado... muito obrigado!

Ao meu namorido **André**... Obrigado pela leveza/suavidade no caminhar, por estar ao meu lado! “Não sei se o mundo é bão. Mas ele está melhor. Desde que você chegou...”

Aos meus amigos de pós-graduação... **Glau**, **Renatinha, Carol, André, Helô, Pinga, Assis, Raquel, Dani**... Tê-los como amigos, foi o melhor presente que a vida podia me dar... quero pra sempre e desejo mais a vocês do que quero pra mim... Sucesso... Brilhem muito! (até porque tenho que dizer que vocês são meus amigos é claro!...)

Aos meus amigos da UEL... **Daniel, Miura, Jonathas, Zé, Fernanda, Bia, Aldair, João, Thais, Ana Sue, Vitor, Beth**... Obrigado pela ajuda e disponibilidade! pelas risadas, pelos almoços no RU, pelos cafezinhos, pelos bons momentos passados aí. Embora fosse uma fase “tensa” de muito trabalho, a companhia de vocês tornou tudo mais fácil! Agradecer a vocês é muito pouco...

Aos meus amigos de vida... **Maykon, Taísa, Gabi, Beto, Dani, Laíza, Bel, Carol, Rachel, Valeska, Zulmira**... Obrigado por aguentar minhas “rabugices”, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, me guiando (quando eu saio do trilho...), dando risada, me fazendo sentir especial... Obrigado pelo prazer da presença de vocês e acima de tudo pela Amizade Verdadeira!

A todos os companheiros de Botucatu... **Carol, Priscila, Gabi, Karrenato**... Vocês são muito especiais! (embora fiquem “disputando” a Fabi comigo...)

Agradeço a todos do laboratório de virologia do IB- Botucatu, Prof. Dr. **João Pessoa, Leila, Camila, Jack, Michele, Thais, Claudia**... Obrigado pela ajuda durante os PCRs, pela disposição, conversas, cafés...

Aos Profs. Drs. **Marcia Rita Fernandes Machado**, **Samir Issa Samara**, **Athos de Assumpção Pastore** e **Eliandra Antonia Pires Buttler**, pela elegante participação na banca de qualificação e pelas primorosas correções realizadas nesse trabalho;

Ao Prof. Dr. **Luis Antonio Mathias** pela ajuda nas correções iniciais, pela disponibilidade do laboratório e “tira-dúvidas” constante...

Agradeço aos funcionários da pós-graduação da FCAV... **Márcia, Diego, Rodrigo, Gabriela, Antônio, Moyses** e **demais**... sempre muito cordiais e atenciosos;

Aos proprietários dos canis onde foram colhetadas as amostras de sangue para a realização desse estudo, principalmente às senhoras **Gisela Alvarenga de Souza** e **Sheila Beder Pizzini** (Kennel Clube de Ribeirão Preto);

Enfim... Agradeço a **TODOS** aqueles que por um lapso de memória deixei de citar...

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado;

À **FAPESP**, Processo nº 13/06993-1, pela concessão do auxílio pesquisa;

Agradeço a todos os **CÃES**, que sem opção, doaram um pouquinho de sangue para que esse estudo fosse realizado!

Obrigado meu **Deus**, por mais essa conquista! **“Tudo posso naquele que me fortalece!”... Amém**

SUMÁRIO

RESUMO ..... **iii**
ABSTRACT ..... **iv**
LISTA DE ABREVIATURAS ..... **v**
LISTA DE TABELAS ..... **vi**
LISTA DE FIGURAS ..... **vii**
1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA **1**
2. OBJETIVO **2**
3. REVISÃO DA LITERATURA **2**
3.1 Herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) 2
3.2 *Toxoplasma gondii* 6
3.3 *Neospora caninum* 11
3.4 *Brucella canis* 16
3.5 *Leptospira* spp 19
3.6 *Ehrlichia canis* 22
4. MATERIAL E MÉTODOS **24**
4.1 Aspectos Éticos 24
4.2 Local do estudo 24
4.3 Delineamento Amostral 25
4.4 Animais 26
4.5 Colheita e preparação das amostras 27
4.6 Aplicação de Questionário 28
4.7 Testes sorológicos 28
4.7.1 T. gondii 28
4.7.2 N. caninum 30
4.7.3 B. canis 31
4.7.4 Leptospira spp 32
4.8 Testes moleculares 33
4.8.1 E. canis 33
4.8.2 Herpesvírus canino 34
4.9 Análise dos dados 36
5. RESULTADOS **37**

6. DISCUSSÃO..... **45**
7. CONCLUSÕES..... **50**
8. REFERÊNCIAS **51**
9. ANEXOS..... **64**

TRANSTORNOS REPRODUTIVOS CAUSADOS POR AGENTES INFECCIOSOS EM ANIMAIS DE CANIS COMERCIAIS DA MICROREGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO – A criação comercial de cães é uma atividade econômica importante no Brasil e tem aumentado, em média, 20% ao ano. Tais empresas têm se preocupado cada vez mais no aprimoramento das raças, modernização e utilização de biotecnologias da reprodução. Contudo, a *performance* reprodutiva é desconsiderada neste tipo de criação, apesar de perdas expressivas em vista de transtornos reprodutivos, causados por manejo sanitário inadequado, culminando em abortamentos e perdas de neonatos. Em vista disto, objetivou-se com este estudo efetuar um levantamento epidemiológico do Herpesvírus canino tipo 1, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis*, *Leptospira* spp e *Ehrlichia canis* em canis comerciais e correlacionar os achados com a ocorrência de transtornos reprodutivos, idade, sexo e raça. Foram colhidas amostras de sangue de 400 cães adultos com idade média 29,1 ± 8,9 meses, de canis comerciais localizados na microrregião de Ribeirão Preto, SP, para realização de testes sorológicos e moleculares. Os dados sobre manejo sanitário e reprodutivo foram colhidos em forma de entrevistas aplicados ao proprietários dos canis. O estudo foi baseado na ocorrência de *Brucella canis* (imunocromatografia), *Toxoplasma gondii* (reação de imunofluorescência indireta), *Neospora caninum* (imunofluorescência indireta), *Leptospira* spp (soroaglutinação microscópica), Herpesvírus canino (PCR), *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia* sp (PCR). A análise estatística empregada consistiu no tratamento descritivo geral dos resultados obtidos, avaliados pelo software Epi Info 7, com a determinação das estimativas de prevalência e cálculo do intervalo de confiança das taxas de doenças na microrregião de Ribeirão Preto. Essa análise investigou o efeito simultâneo de vários fatores (doenças) em uma variável resposta (abortamento e morte neonatal). A população canina estudada foi constituída de 108 machos (27,0%, IC95%: 22,65-31,35) e 292 fêmeas (73,0%; IC95%: 68,65-77,35). A prevalência dos patógenos estudados foi *B. canis* (15,0%; IC95%: 11,50-18,50), *T. gondii* (17,3%; IC95%: 13,55-20,95), *N. caninum* (30,50%; IC95%: 26,19-35,18), *Leptospira* spp (34%; IC95%: 29,53-38,77), *Ehrlichia* sp (4,5%; IC95%: 2,87-7,00) e *E. canis* (15,5%; IC95%: 11,95-19,05). Nenhum caso positivo de Herpesvírus canino foi encontrado. Quando a variável dependente abortamento foi avaliada observou-se associação significativa com as infecções por *T. gondii* (p = 0,004260) e *B. canis* (p = 0,0000012). E ao avaliar a frequência de natimortos frente as infecções observou-se associação entre a frequência de natimortos e infecção por *Leptospira* spp (p=0,0058), *Brucella canis* (p=0,1 x 10^{-10}) e *Toxoplasma gondii* (p=0,01034). Baseado nos resultados, nas condições deste estudo, conclui-se que o *T. gondii,* a *B. canis*, e a *Leptospira* spp são patógenos responsáveis por perdas econômicas por estarem relacionados a abortamentos e morte de neonatos e filhotes em canis comerciais.

Palavras-chave: abortamento, cães, doenças infecciosas, reprodução

REPRODUCTIVE DISORDERS CAUSED BY INFECTIOUS AGENTS IN ANIMALS OF THE COMMERCIAL KENNELS AT RIBEIRÃO PRETO MICROREGION, SÃO PAULO STATE

ABSTRACT - The commercial kennel breeding is an important economic activity in Brazil and has increased, in media, on 20% per year. The breeding has given importance to concern in the improvement of breeds, modernization and use of reproductive biotechnologies. Nevertheless, the reproductive performance is overlooked in breeding of dogs, though of significant losses due of reproductive disorders caused by inadequate sanitary management, culminating in abortions and neonatal/pup losses. Thus, the aim of this study was investigated the infectious causes of abortion and neonatal/pup deaths in commercial kennels. Blood samples from 400 dogs with an average age 29.1 ± 8.9 months were collected from kennels located in the microregion of Ribeirão Preto, SP, for serological and molecular. The data regarding to health and reproductive management were collected by a questionnaire. The studied was based on prevalence of *Brucella canis* (imunochromatography), *Toxoplasma gondii* (indirect immunofluorescence reaction), *Neospora caninum* (indirect immunofluorescence), *Leptospira* ssp (microscopic soroagglutination), canine Herpesvirus (PCR), *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia* sp (PCR). The statistical analysis was descriptive, and we used the simple and multiple linear regressions to verify the interaction between dependent variables (abortion and neonatal/pup deaths) and percent positive cases. Canine population studied consisted of 108 males (27,0%, IC95%: 22,65-31,35) and 292 females (73,0%; IC95%: 68,65-77,35). The prevalence of diseases studied was *B. canis* (15,0%; IC95%: 11,50-18,50), *T. gondii* (17,3%; IC95%: 13,55-20,95), *N. caninum* (30,50%; IC95%: 26,19-35,18), *Leptospira* spp (34%; IC95%: 29,53-38,77), *Ehrlichia* sp (4,5%; IC95%: 2,87-7,00) and *E. canis* (15,5%; IC95%: 11,95-19,05), There was no positive case of canine herpesvirus. When the variable abortion was avaliable we can got one association with *T. gondii* ($p = 0,004260$) and *B. canis* ($p = 0,0000012$). When we available percentage of neonatal/pup deaths we can got one association with *Leptospira* spp ($p = 0,0058$), *Brucella canis* ($p = 0,1 \times 10^{-10}$) and *Toxoplasma gondii* ($p = 0,01034$). Based on our results, in condition of this study, we concluded that *B. canis, T. gondii* and *Leptospira* spp are pathogens responsible to economic losses to be related to abortion and promotes the death of neonates and pups in commercial kennels.

Keywords: abortion, dogs, infectious diseases, reproduction

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT.....Antígeno Acidificado Tamponado
BSA.....Albumina Sérica bovina
BoHV-1.....Herpesvírus bovino tipo 1
°C.....Graus Celsius
DNA.....Ácido Desoxirribonucleico
EDTA.....Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA.....Ensaio Imunoenzimático
FC.....Fixação de Complemento
FITC.....Isotiocinato de Fluoresceína
H_2S.....Sulfeto de Hidrogênio
HA.....Reação de Hemaglutinação
IDGA.....Imunodifusão em Gel de Ágar
IFI.....Imunofluorescência Indireta
ISAGA.....Aglutinação por Imunoabsorção
ME.....2-Mercaptoetanol
µm.....Micrômetro
PBS.....Tampão Fosfato Salina
PCR.....Reação em Cadeia de Polimerase
PI.....Pós - Infecção
RFLP…… Restriction Fragment Length Polymorfism
RIFI.....Reação de Imunofluorescência Indireta
SAL.....Soro aglutinação Lenta
SAM.....Soro Aglutinação Microscópica
SNC.....Sistema Nervoso Central
SuHV-1.....Pseudo-vírus

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014. 41

Tabela 2 - Prevalência de *B. canis* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014... 42

Tabela 3 - Prevalência de *T. gondii* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014. 42

Tabela 4 - Prevalência de *N. caninum* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014. 43

Tabela 5 - Prevalência de *Ehrlichia* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014. 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Georreferenciamento da região estudada 26
Figura 2. Georreferenciamento dos canis estudados no município de Ribeirão Preto. 27
Figura 3. Fotografia da sequência da Reação de imunofluorescência indireta para *T. gondii* e *N. caninum,* respectivamente. Resultados positivos avaliados em microscopia de epifluorescência. 30
Figura 4. Fotografia do bioensaio para detecção de anticorpos contra *Brucella canis*. 32
Figura 5. Fotografia do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), mostrando resultado positivo para a sorovariedade Panama. 33
Figura 6. Demonstração da *melting* da curva de dissociação para *Ehlichia sp* e *Ehrlichia canis*. 34
Figura 7. Demonstração da temperatura de *melting* da curva de dissociação para Herpesvírus canino.. 36
Figura 8. Número geral e porcentagem de casos positivos para os patógenos estudados em nove canis comerciais, na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, 2014. 39
Figura 9. Porcentagem de casos positivos para os patógenos estudados em nove canis comerciais, na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, 2014…40
Figura 10. Soroprevalência de aglutininas anti–*Leptospira* spp em machos e fêmeas oriundos de canis comerciais, na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, 2014. 41
Figura 11. Porcentagem de abortamentos e natimortos nos 9 canis comerciais estudados. 44

1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

A crescente comercialização de animais de companhia culmina em exorbitante aumento de canis para esses fins. Tais empresas têm se preocupado cada vez mais no aprimoramento das raças, modernização e utilização de biotecnologias disponíveis para esta espécie, contudo prejuízos significativos nesta atividade têm ocorrido em virtude de disfunções na reprodução, ocasionadas por agentes infecciosos (MAGNABOSCO, 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007).

Problemas reprodutivos como a baixa taxa de concepção, perda embrionária, abortamento, filhotes natimortos ou subdesenvolvimento dos neonatos são situações preocupantes para criadores de cães, que chegam a perder ninhadas inteiras de uma mesma matriz, sem ter as causas diagnosticadas (DAHLBOM et al., 2009).

O Brasil possui a segunda maior população de animais de companhia do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (MARQUEZI, 2007) e o conhecimento do perfil de distribuição de doenças, a prevalência e a ocorrência na população canina é fundamental para que sejam tomadas atitudes que favoreçam o controle e consequentemente diminuam as mortes. Tal preocupação é fundamental por ser a criação de cães uma atividade econômica e por ser um animal de íntimo contato com o homem, aumentando as chances de perpetuação de zoonoses.

O papel desempenhado por diversos organismos infecciosos causadores de infertilidade em cães, são descritos em estudos que ressaltam a dificuldade no diagnóstico diferencial e isolamento dos patógenos, dentre estes a *Brucella canis* e o herpesvírus canino, que mantém o animal portador sadio, mas continua sendo um transmissor em potencial do agente para animais susceptíveis (DAHLBOM et al., 2009).

O crescente desenvolvimento urbanístico apresenta disparidades, isto é, a distribuição da população animal segue padrões de desigualdade. O crescimento populacional de cães tem acompanhado o humano e associado a isto o crescimento de diversas zoonoses, como a brucelose, toxoplasmose, leptospirose e a neosporose, as quais deveriam ser investigadas rotineiramente na população humana. Quanto à toxoplasmose e a neosporose animal, a pesquisa desses

agentes na população canina é fundamental, visto que a sua transmissão ao homem e sua patogenicidade em animais de produção e de companhia (GARCIA et al., 1999).

Tendo em vista a importância da criação de cães devido seu contato estreito com o homem e, sendo esta uma importante atividade econômica no país, com crescimento de 20% ao ano (MARQUEZI, 2007), torna-se presente os estudos para investigar as principais causas infecciosas de alterações reprodutivas em canis comerciais.

2. OBJETIVO

O objetivou desse estudo foi efetuar um levantamento epidemiológico do *Herpesvírus canino* tipo 1 (CaHV-1), *Toxoplasma gondii, Neospora caninum*, *Brucella canis*, *Leptospira spp* e *Ehrlichia canis* em animais de canis comerciais na microrregião de Ribeirão Preto, região nordeste do Estado de São Paulo, correlacionando os dados com a ocorrência de transtornos reprodutivos, idade, sexo e raça.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1)

O herpesvírus canino do tipo 1 (CaHV-1) é um membro da família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, contendo o herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1), o herpesvírus eqüino tipo 1 (EHV-1), o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o pseudo-vírus (SuHV-1) (MIYOSHI et al., 1999; FLORES, 2007). Foi descrito pela primeira vez em meados da década de 60 como o agente causal de uma doença septicêmica fatal em filhotes de cães (KIM, 2004). Acreditava-se, a princípio, que se tratava de um microrganismo semelhante ao *Mycoplasma,* apesar de apresentar semelhanças compatíveis aos herpesvírus (STRANDBERG; CARMICHAEL, 1965).

A estrutura do genoma do CaHV-1 é semelhante ao de outros membros da subfamília Alphaherpesvírus. Várias análises sequenciais de genes de CaHV-1 têm demonstrado uma estreita afinidade genética com o herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1), herpesvírus equino tipos 1 e 4 (EHV-1 e EHV-4)(DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), além dos herpesvírus simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) que estão relacionados a doenças orofaciais e genitais respectivamente (LEDBETTER et al., 2009).

A espécie hospedeira de CaHV-1 fica restrita aos cães domésticos embora existam relatos de canídeos selvagens como portadores dos vírus (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008; LEDBETTER et al., 2009). Anticorpos contra o CaHV-1 foram detectados em soros de raposas vermelhas européias (*V. vulpes*) na Austrália e na Alemanha, assim como em soros de lontras dos rios norte-americanos (*Lontra canadensis*), e em amostras séricas de um exemplar de filhote de coiote criado em cativeiro (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). O número restrito de espécies utilizadas como hospedeiros pelo CaHV-1 levou a especulações sobre suas semelhanças biológicas e propriedades fisiológicas entre outros membros do grupo dos alphaherpesvirus, que são caracterizados por uma gama hospedeira bastante ampla, como o herpesvírus simplex em humanos (STRANDBERG; AURELIAN, 1969).

Estudos concluíram que existem diferentes cepas de CaHV-1 para cada sinal clínico apresentado, principalmente entre os problemas respiratórios e reprodutivos (RONSSE et al., 2005).

A transmissão do herpesvírus canino ocorre por contato direto de um cão sadio com secreções genitais, oronasais ou pela via transplacentária (NÖTHLING et al., 2008). A idade no momento da infecção é fundamental para o aparecimento dos sinais clínicos e o desenvolvimento da doença. Em filhotes com idade entre uma e duas semanas de vida, causa doença necrosante generalizada fatal e doença hemorrágica, enquanto que a infecção acima de duas semanas de idade e cães adultos é muitas vezes assintomática (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

Nos cães adultos, o CaHV1 pode causar apenas infecções leves no trato respiratório superior ou genital, que muitas vezes não são notadas (RIJSEWIJK et

al., 1999), sendo identificado e isolado de esfregaços da córnea em animais com úlceras na mesma (ALBERT et al., 1976; DECARO, MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Estudos apontam que demais problemas oculares podem estar relacionados à presença do agente viral como: displasia da retina, atraso na maturação da retina e áreas de necrose (ALBERT et al., 1976). Em populações susceptíveis de cães domésticos, o CaHV-1 pode estar associado a surtos de infecção ocular altamente contagiosa, mesmo na ausência de doença sistêmica concomitante evidente. Ceratites ulcerativas e não ulcerativas foram menos prevalentes e de aspecto clínico variável (LEDBETTER; KIM; DUBOVI, 2009; LEDBETTER et al., 2009).

O óbito é mais comum em filhotes com até quatro semanas de vida e neonatos podem também ser infectados durante a passagem pelo canal do parto. A elevada susceptibilidade em recém-nascidos ao CaHV-1 pode estar relacionada à baixa temperatura corpórea dos mesmos, uma vez que o agente viral tem afinidade por baixas temperaturas. O curso da doença nos filhotes é de um a três dias. Os sinais clínicos incluem desde a vocalização, anorexia, dispnéia, dor abdominal, incoordenação, fezes amolecidas, secreção nasal, hipotermia (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008; RODRIGUES, et al., 2008). Secreção nasal serosa ou hemorrágica e petéquias nas mucosas também podem ser observadas.

Em filhotes com menos de uma semana de idade, o vírus pode ser isolado de órgãos como o fígado, os rins, tecidos linfáticos, pulmões e sistema nervoso central. O período de incubação é de aproximadamente seis a dez dias em animais com mais de duas a três semanas de vida. Após o período de infecção, seja este sintomático ou assintomático, o vírus permanece em latência no sistema nervoso e pode ser excretado em intervalos de tempo imprevisíveis ao longo de vários meses ou anos. A reativação desse agente latente pode ser provocado por fatores ambientais ou estresse social, experimentalmente, por imunossupressores (corticosteróides) (LEDBETTER; et al., 2009) ou soro anti-linfócito (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

Problemas reprodutivos tais como baixa taxa de concepção, suspeitas de reabsorção fetal, fetos mumificados, abortamentos e diminuição no tamanho da ninhada são achados frequentes em animais infectados por CaHV-1 (DAHLBOM et al., 2009).

Um cão, uma vez infectado com CaHV-1, provavelmente será portador do vírus ao longo da vida e uma fonte em potencial de transmissão. Pouco se sabe sobre a correlação entre o estado de portador e a presença de anticorpos contra o vírus. Normalmente, um cão infectado com CaHV-1 desenvolve anticorpos detectáveis em um prazo de duas a três semana aproximadamente. Por outro lado, outros alphaherpesvírus são conhecidos por permanecerem presentes em portadores soronegativos (RIJSEWIJK; et al., 1999).

O vírus persiste na forma latente no gânglio do nervo trigêmeo e em outros sítios como os gânglios lombo-sacrais, amígdalas e glândulas salivares parotídeas. Filhotes infectados experimentalmente e mantidos à temperatura corpórea de 38,5ºC a 39,5ºC sobreviveram à infecção, porém apresentaram danos neurológicos permanentes. Da mesma forma, o dano neurológico residual pôde ser observado em cães infectados e submetidos a tratamento de suporte e medicamentos antivirais (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

Animais que apresentam o vírus em latência representam uma fonte de infecção para animais susceptíveis, o que torna a situação preocupante em cães reprodutores que podem assegurar a transmissão de CaHV-1 por meio de secreções genitais em colônias de criação. Necrose em placenta é observada em cadelas gestantes infectadas. Lesões fetais são semelhantes às observadas em filhotes afetados (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

O vírus é sensível a solventes lipídicos, facilmente inativado quando exposto a temperaturas superiores a 40°C e, rapidamente, inativado por desinfetantes comuns, à temperatura ambiente (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

O diagnóstico de infecção por CaHV-1 pode ser obtido pelo isolamento do vírus em linhagens celulares. O crescimento viral é observado em cultivos celulares de coração, fígado, pulmão, rim, sistema nervoso central (RODRIGUES et al., 2008) e de tecido testicular (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

A temperatura ideal para o crescimento fica entre 34º C a 35° C e com baixo rendimento do cultivo em temperaturas superiores a 36º C.

Análises moleculares pela técnica de Reação em cadeia de polimerase (PCR) podem ser realizadas, aumentando a sensibilidade de detecção antígena e a confiabilidade do diagnóstico (RONSSE et al., 2005). Hibridização *in situ* e métodos

de *nested* PCR tem sido usados para detectar sequencias de ácidos nucléicos com muita especificidade. Ambos os métodos são usados como ferramentas importantes na pesquisa tanto na medicina quanto na medicina veterinária, como métodos diagnósticos rápidos e precisos em várias infecções virais (SCHULZE; BAUMGÄRTNER, 1998). As técnicas do *nested* PCR e da hibridização *in situ* podem ser aplicadas através de amostras de tecidos infectados naturalmente ou experimentalmente (MIYOSHI et al., 1999).

Exames sorológicos para avaliar os anticorpos neutralizantes podem ser úteis nos estudos e controle da ocorrência de CaHV-1. Os recém-nascidos infectados com o CaHV-1 geralmente morrem sem formação de anticorpos neutralizantes, mas níveis maternos de apenas 1:4 ou mais podem ser correlacionados com a infecção e morte de neonatos (READING; FIELD, 1999).

Em países onde a vacina é utilizada para prevenção da doença, a presença de anticorpos contra o CaHV-1 em animais não vacinados, indica uma exposição prévia ao vírus. Resultados de estudos afirmam que os títulos de anticorpos contra CaHV-1 pode subir e descer dentro de quatro a oito semanas após a exposição ao agente (NÖTHLING et al., 2008).

Diversos estudos nos continentes asiático e europeu apontam para uma alta prevalência do vírus entre a população canina (STWEART et al., 1965; KIM, 2004), aumentando as evidências que a sua difusão entre a população canina mundial esteja acima do esperado, representando um alto índice de perdas econômicas para criadores, sérios problemas reprodutivos, alta taxa de mortalidade em recém-nascidos, dificuldade na prevenção e no diagnóstico da doença (KIM, 2004).

Estudos no Brasil ainda são escassos, necessitando um conhecimento maior da biologia e da ocorrência do agente viral nas colônias de cães em território brasileiro, reforçando a importância desta pesquisa.

3.2 *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é um protozoário coccídio, parasito intracelular obrigatório, com ciclo biológico complexo e que acomete praticamente todas as espécies animais de sangue quente (DUBEY, 2006). A toxoplasmose é uma zoonose, mundialmente

disseminada, identificada em inúmeras espécies de mamíferos e aves (KAWAZOE, 1995), que promove expressivas perdas econômicas devido a transtornos reprodutivos como reabsorção fetal, abortamentos em diferentes fases gestacionais, mumificação fetal e natimortalidade (BRESCIANI, 2003).

No seu ciclo, o *T. gondii* se apresenta sob formas evolutivas infectantes: os taquizoítos, estruturas de rápida multiplicação, que ocorrem na infecção aguda e os bradizoítos, confinados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica. Já os oocistos são o produto final da reprodução sexuada, formados somente no trato digestivo dos felídeos, seus hospedeiros definitivos (MILLER; FENKEL; DUBEY, 1972), que os eliminam juntamente com as fezes onde, por meio da esporogonia, tornam-se infectantes, sendo extremamente resistentes às condições ambientais, de acordo com Ylmaz e Hopkins (1972). Nos demais animais e no homem ocorre apenas o ciclo extraintestinal, característico dos hospedeiros intermediários e que também ocorre nos felinos. Estas formas evolutivas estão disseminadas, principalmente, em áreas frequentadas por gatos (RUIZ; FRENKEL; CERDAS, 1973), pois os felídeos são o ponto chave da epidemiologia da toxoplasmose.

A infecção provocada pelo *T. gondii* ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos (ARAUJO; SILVA; LANGONI, 1998; OLIVEIRA; SABATINI; COSTA, 2001), por meio da via transplacentária (BRESCIANI et al., 2008) ou transmamária (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009).

A toxoplasmose canina foi descrita pela primeira vez em Turim, na Itália, por Mello (1910) e no Brasil por Carini (1911) e Carini e Maciel (1913) e desde então relatada nessa espécie animal por diversos autores (BRESCIANI et al., 2008a).

Devido ao elevado índice de animais naturalmente infectados por esse agente reconhecidamente oportunista, e sua correlação com doenças imunossupressivas, como a cinomose (MORETTI et al., 1997), deve-se atentar para a ocorrência desta enfermidade na espécie canina (BRESCIANI et al., 2008a).

Em cães e gatos a infecção por ingestão de pequenos mamíferos e pássaros é importante, principalmente em animais semidomiciliados, soltos ou alimentados com carne crua (DUBEY et al., 2005; DUBEY, 2006). Embora o cão não seja o hospedeiro definitivo do *T. gondii*, ele contribui na disseminação mecânica desta

enfermidade (SCHARES et al., 2005; FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009; MASCOLLI, 2010), e sua infecção se dá na maioria das vezes pelo carnivorismo comum dessa espécie (MASCOLLI, 2010).

A xenosmofilia pela lambedura de cães infectados ainda é controversa, enquanto que a urina e a saliva (BRESCIANI et al., 2001; DUBEY et al., 2005), transplante de órgãos, transfusão sanguínea ou ainda acidentes laboratoriais que envolvam a manipulação do parasito são vias de transmissão consolidadas (MASCOLLI, 2010). No homem o *T. gondii* pode permanecer assintomático por longos períodos, com exceção de indivíduos imunossuprimidos, o que torna o hospedeiro susceptível à proliferação do parasito pelo caráter oportunista, igualmente ao que ocorre nos cães (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009; MASCOLLI, 2010).

A maioria dos cães infectados experimentalmente permaneceu assintomático, poucos adoeceram e raramente aconteceram óbitos (DUBEY,1985). Os sinais clínicos da toxoplasmose são bem variados desde uma simples hipertermia, aumento discreto ganglionar, até sintomas graves como anorexia, diarreia, comprometimento do sistema nervoso central, alterações oculares provocando cegueira ou aborto (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009), distúrbios pulmonares e digestivos, além de lesões oculares (MORETTI et al., 2002).

Oocistos esporulados de *T.gondii* podem atravessar o trato intestinal dos caninos e serem excretados juntamente com as fezes nesse mesmo estágio infeccioso, o que torna o cão um potente transmissor dessa parasitose (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009).

Em cadelas com diferentes estágios gestacionais, a infecção pelo *T. gondii* pode provocar mortalidade dos filhotes do 4º ao 75º dias pós-nascimento. Cadelas no terço médio e final da gestação, experimentalmente infectadas com oocistos ou taquizoítos, apresentaram aborto e morte fetal (BRESCIANI, 2003). Filhotes originários de mães infectadas nasceram sorologicamente positivos, sendo aparentemente saudáveis com exceção de um neonato que se mostrou debilitado (BRESCIANI, 2003; BRESCIANI et al., 2009), o que confirma a via transmamária relatada por Fialho, Teixeira e Araujo (2009).

Os órgãos mais comumente lesados pelo Toxoplasma em cães são pulmões

e fígado (RHYAN; DUBEY, 1992), no entanto, Sogorb et al. (1972) destacaram o tropismo de *T. gondii* pelo cérebro.

A infecção em cães é de difícil diagnóstico devido ao caráter crônico da doença, o que apresenta uma alta infectividade e baixa patogenicidade (NAVARRO et al., 1997).

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito pela pesquisa do coccídeo (exame parasitológico), métodos indiretos (imunológicos) ou por biologia molecular. A pesquisa de oocistos pode ser realizada nas fezes de felinos, pelo método de centrifugoflutuação com solução de Sheather, mas como os gatos são assintomáticos, detectar o estágio de eliminação do parasito, torna o exame de fezes um método ineficaz (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009). A pesquisa direta do *T. gondii* pode ser feita a partir de diversos componentes orgânicos como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, leite, placenta, medula óssea, baço fígado e linfonodos. Esses componentes podem ser utilizados para inoculação em camundongos e os órgãos para histopatologia (NAVARRO et al., 1997). Exames histopatológicos associados à imunohistoquímicos têm sido utilizados experimentalmente com resultados satisfatórios (BRESCIANI et al., 2008a).

A sorologia, diagnóstico imunológico, tem sido um método indicado para detecção de anticorpos específicos de *T. gondii*. Reações de hemaglutinação (HA), imunofluorescência indireta (IFI), aglutinação por imunoabsorção (ISAGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido utilizados (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009).

A Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o método mais comumente utilizado (BRESCIANI et al., 2008b), com sensibilidade em torno de 83.87% e especificidade de 79.16% (MASCOLLI, 2010), pois evidencia anticorpos contra os antígenos de superfície do *T.gondii* durante a fase de proliferação e em infecções crônicas sintomáticas ou não (NAVARRO et al., 1997), seguido da técnica de ELISA (MASCOLLI, 2010).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada em quatro amostras de cães sabidamente positivas para *T. gondii*. Dentre as amostras avaliadas, três foram positivas para o parasito e uma delas foi considerada negativa, pela técnica molecular. Estes resultados demonstraram que a PCR, embora seja uma importante ferramenta diagnóstica, não substitui os métodos convencionais de diagnóstico da

toxoplasmose (BRESCIANI et al., 2008).

Embora estudos sorológicos que investigam a ocorrência de toxoplasmose em cães sejam pontuais, eles relatam uma prevalência alta (NAVARRO et al., 1997; MASCOLLI, 2010).

Não houve diferença significativa entre estações do ano, localização e sexo, sendo que machos e fêmeas têm a mesma chance de contágio, segundo o estudo de Ishizuka e Yasuda (1981). Diferença significativa entre a ocorrência da infecção por *T. gondii* e o consumo de alimentação caseira foi evidenciado, assim como foi demonstrado maior taxa ou ocorrência de infecção em cães errantes, ou seja, a rua foi um fator de proteção. Não houve associação da faixa etária, sexo ou presença de roedores (SILVA et al., 2010). Contradizendo os achados anteriores foi demostrada uma infecção nas cadelas de 1.6 vezes maior que dos machos (COIRO et al., 2011).

A prevenção da toxoplasmose humana se dá pelo consumo de alimentos seguros e deve ser salientada a importância da boa higiene de mãos e utensílios após o manuseio de carne crua ou contato com terra ou areia (MASCOLLI, 2010; COIRO et al., 2011); Água não filtrada foi sugerida como possível veículo de oocistos esporulados (COIRO et al., 2011).

Para o controle ou prevenção da toxoplasmose animal a coprofagia deve ser impedida e recomenda-se o fornecimento de produtos cárneos cozidos ou rações comercializadas. Assim como na prevenção humana, a eliminação de hospedeiros paratênicos, como moscas e baratas é imprescindível, além de se evitar o contato com solo ou areia que possam estar contaminados com fezes de gatos, atentando-se para a limpeza diária da caixa de areia de felinos, a fim de reduzir a contaminação ambiental (DUBEY, 2006; MASCOLLI, 2010; COIRO et al., 2011).

Inquéritos epidemiológicos de toxoplasmose em humanos no Brasil apresentam taxas expressivas, em torno de 25%, sendo maior em veterinários, magarefes, pessoas que lidam com gatos, ressaltando o caráter ocupacional da doença (TORRES, 1997; MASCOLLI, 2010; COIRO et al., 2011). No Brasil a toxoplasmose não é uma doença de notificação compulsória, o que dificulta o conhecimento de dados oficiais de sua prevalência, assim como seu fator de impacto (zoonótico) sobre a população.

3.3 *Neospora caninum*

A neosporose é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário *N. caninum*, da família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Neospora*, pertencente ao grupo dos parasitos coccídeos formadores de cistos. A essa enfermidade estão associados distúrbios neurológicos em cães, além de ser considerada a principal causa de abortos em bovinos em algumas localidades (DUBEY et al., 1996).

Nos Estados Unidos Bjerkås, Mohn e Presthus (1984), foram os primeiros a isolar e descrever essa infecção como causadora de encefalomielite e miosite em cães, na década de 80, sendo que até meados de 1988, o *N. caninum* era erroneamente identificado como *T. gondii* por sua semelhança estrutural, embora sejam antigenicamente distintos com estágios infecciosos também diferentes (DUBEY et al., 1988).

O cão (*Canis lúpus familiaris*) é o hospedeiro definitivo do *N. caninum* (DUBEY et al., 1996) e eliminam oocistos desse protozoário pelas fezes, após a ingestão de tecidos (carne bovina infectada) (CAVALCANTE et al., 2011), transmitindo para outras espécies e contaminando o meio ambiente.

Estudos comprovaram que outros canídeos também podem ser hospedeiros definitivos de *N. caninum*, como o coiote (*Canis latrans*), o dingo australiano (*Canis domesticus*) e o lobo (*Canis lupus*) (KING et al., 2010; DUBEY; SCHARES, 2011). Possivelmente outros canídeos também possam fechar o ciclo do protozoário, como o sorro (*Pseudalopex gymnocercus)*, graxinins (*Cerdocyon thous)* ou cachorros do mato da região sul do Rio Grande do Sul, nos quais já foram encontrados anticorpos para Neospora (GENNARI et al., 2002). No entanto, oocistos viáveis só foram demonstrados nas fezes de cães e lobos naturalmente infectados (DUBEY; SCHARES, 2011).

O ciclo do *N. caninum*, assim como do *T. gondii* têm sido alvo de pesquisas devido sua importância na criação de cães e gatos, assim como a exploração de seus potenciais zoonóticos (GIVENS; MARLEY, 2008; PRETZER, 2008).

Tanto a fase sexuada como a fase assexuada de multiplicação do parasito podem ser completadas no cão (DUBEY et al., 2002), o que o classifica juntamente com os canídeos silvestres em hospedeiros definitivos e intermediários (TAVARES

et al., 2013). Inclusive já foram encontrados cistos musculares em psitacídeos indicando que pode haver um número muito maior de hospedeiros intermediários do que os conhecidos atualmente (MINEO et al., 2011).

A ingestão dos oocistos esporulados na água e em alimentos contaminados é a forma de infecção dos hospedeiros intermediários, que termina na formação dos cistos teciduais onde o parasito assume a forma de bradizoíto, localizado especialmente no sistema nervoso central (BATISTA, 2012).

Taquizoítos de *N. caninum* são ovóides ou globulares e medem 3-7 x 1-5 µm, e os cistos teciduais são ovalados com até 107 µm de comprimento, ambos são intracelulares. Esses estágios são encontrados nos hospedeiros intermediários geralmente no sistema nervoso central; Cistos teciduais também foram encontrados na musculatura de cães e bovinos infectados (DUBEY et al., 2002).

Cães alimentados com cistos teciduais podem eliminar oocistos, que vão esporular no ambiente em até 24 horas (DUBEY, 1999). Os oocistos têm 10-12 µm de diâmetro e possuem uma parede transparente, com 0.6-0.8 µm de espessura. Após esporularem, contêm dois esporocistos que medem cerca de 8.4 x 6.1 µm, com quatro esporozoítos cada. Os esporozoítos são alongados, medindo 6.5 x 2.0 µm (DUBEY et al., 2002). Os oocistos são morfologicamente semelhantes à *Hammondia heydorni* encontrada nas fezes de cães e de *T. gondii* e *Hammondia hammondi* encontrados nas fezes de gatos.

Ainda não se sabe a frequência da eliminação de oocistos de *N. caninum,* nem a durabilidade desses oocistos no ambiente, porém McAllister et al. (1998) e Lindsay et al. (1999) mostraram que os cães eliminam uma baixa quantidade de oocistos, independente de sua idade ou imunocompetência. Mineo et al. (2011) demonstraram que esses oocistos são tão resistentes quanto o de outros coccídeos.

Existem hoje vários métodos laboratoriais para o diagnóstico da neosporose. As provas sorológicas mais utilizadas para a detecção do agente são RIFI, ELISA e western blotting (DUBEY et al., 1988). Para estudos de epidemiologia, também realizados em humanos, são empregados teste indiretos, ou seja, aqueles que verificam a presença de anticorpos anti-*N. caninum,* como o teste de aglutinação direta (BJORKMAN et al., 1997).

A RIFI é considerada a técnica de referência para o diagnóstico sorológico da

infecção por *N. caninum* (DUBEY; SCHARES, 2011). Taquizoítos intactos são utilizados como antígenos sendo assim, o teste detecta anticorpos contra os antígenos presentes na superfície celular do parasito (BJORJMAN; UGGLA, 1999). Títulos maiores ou igual a 1:50 indica a exposição do cão ao agente e títulos maiores ou igual a 1:800, em cão com sinais clínicos é forte indício de neosporose (DUBEY; SCHARES, 2011).

Alguns estudos relatam que pela RIFI, podem ocorrem pouca reação cruzada com outros coccídeos, sendo usado com teste de referência para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (TRESS et al., 1993; DUBEY et al., 1996), entretanto no estudo de Dubey (2003), o autor contradiz essa informação, relatando a ocorrência de reações cruzadas com outros coccídeos como *T. gondii.*

O teste de ELISA para diagnóstico de neosporose foi descrito primeiramente por Björkman et al. (1997) e desde então vários ELISAs indiretos vem sendo padronizados. O ensaio imunoabsorvente ligado à enzima utiliza antígenos solúveis, particularmente proteínas de superfície e não é um teste subjetivo (PARÉ et al., 1995). Borsuk et al. (2011) desenvolveram um teste de ELISA para *N. caninum* em bovinos, utilizando a proteína recombinante NcSRS2 e descrevem o teste como sendo altamente específico e sensível para o diagnóstico sorológico em bovinos.

O teste de aglutinação direta foi descrito primeiramente por Dubey (1999), para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, esse teste foi adaptado para o *N. caninum* por Romand, Thulliez e Dubey. (1998). É um teste relativamente simples e rápido, podendo ser utilizado para o diagnóstico de várias espécies, não necessitando de anticorpos secundários marcados, mas requer uma grande quantidade de taquizoítos intactos (BJÖRKMAN; UGGLA, 1999). Alguns estudos demonstraram que o teste de aglutinação direta pode substituir a RIFI, pois apresenta uma sensibilidade e especificidade comparável com aquela (PACKHMAN et al., 1998).

Os testes diagnósticos diretos são fundamentais para a confirmação da infecção, pois se baseiam na detecção do parasito ou do DNA do agente. Dentre essas técnicas, as principais são a flutuação em sacarose, o bioensaio e a PCR (TAVARES et al., 2013).

A técnica de flutuação em sacarose consiste em uma técnica para a pesquisa

de *N. caninum* em fezes de cães e o princípio está baseado na flutação de oocistos, por densidade, após a centrifugação em solução de sacarose (GONDIM et al., 2002). A dificuldade dessa técnica ocorre pela semelhança entre os oocistos de *Neospora* e *Hammondia*, necessitando de técnicas moleculares para a diferenciação das espécies. O mesmo ocorre com o *T. gondii*, pois as chances de encontrar um cão eliminando oocistos são pequenas (TAVARES et al., 2013).

O bioensaio é uma ferramenta importante para o isolamento do parasito em amostras de cães e bovinos. O modelo animal utilizado é o gerbil (*Meriones unguiculatus),* por apresentar uma maior susceptibilidade à infecção pelo *N. caninum* (DUBEY; LINDSAY, 2000), a dificuldade dessa técnica está na demora de se obter o diagnóstico além da utilização de animais de laboratório.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem sendo relatada como método de diagnóstico para *N. caninum* desde 1996, quando vários estudos envolvendo essa técnica foram publicados, a qual se baseia na amplificação in vitro do DNA do parasito. Existem algumas variantes da técnica de PCR como Nested, RFLP e Real Time, que devido à simplicidade e rapidez do teste além da confiabilidade dos resultados, são recomendadas (REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007).

Cadelas infectadas subclinicamente podem transmitir *Neospora caninum* transplacentariamente a seus fetos, e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas (DUBEY, 1999). A maioria dos casos clínicos ocorre em filhotes, infectados congenitamente (DUBEY; KOESTNER; PIPER, 1990) e caracteriza-se por uma paralisia ascendente, com os membros posteriores geralmente mais afetados, podendo ter hiperextensão rígida ou flácida, provavelmente decorrente da poliradiculoneurite e miosite causadas pela infecção (DUBEY et al., 1988). Podem ainda apresentar dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, cegueira, convulsões, incontinência urinária e fecal, flacidez e atrofia muscular e falha cardíaca (LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999).

Em cães adultos, a apresentação é mais variada e além da sintomatologia nervosa que pode confundir com traumatismos, patologias do disco intervertebral, cinomose, raiva, entre outros, podendo ocorrer dermatite piogranulomatosa, miocardite fatal e pneumonia (DUBEY et al., 1988). Os cães podem sobreviver durante meses com paralisia progressiva, meningoencefalite, insuficiência cardíaca,

complicações pulmonares e, muitas vezes esses precisam ser eutanasiados (BARBER, 1998).

Na necropsia, podem ser constatadas lesões inespecíficas, como áreas de necrose do SNC, granulomas em vísceras, estrias esbranquiçadas nos músculos e megaesôfago, podendo haver ainda hepatomegalia e lesões musculares (atrofia e fibrose) (BARBER, 1998). Para o diagnóstico da neosporose pós-morte é necessário o uso de imunohistoquímica para detectar taquizoítos e cistos nos tecidos fixados (GENNARI et al., 2002).

No exame microscópico, são identificados taquizoítos ou cistos em biópsias de tecidos (músculo) ou em aspirados citológicos (pulmonar, líquor, exudado de pústula dérmica). No SNC são detectados: cistos, meningoencefalomielite multifocal não supurativa, infiltrado perivascular mononuclear ou polimorfonuclear, neovascularização, gliose e meningite (UGGLA et al., 1989).

Pode ocorrer necrose multifocal do miocárdio, com grupos de taquizoítos nos miócitos cardíacos (ODIN; DUBEY, 1993). O fígado apresenta áreas multifocais de necrose e lipidose dos hepatócitos e nos pulmões verifica-se pneumonia intersticial difusa com necrose total de células epiteliais alveolares, hemorragia, edema, macrófagos no espaço alveolar, podendo ainda aparecer taquizoítos (JARDINE; DUBEY, 1992).

A epidemiologia dessa parasitose na população humana ainda é pouco conhecida, embora haja uma preocupação sobre o potencial zoonótico de *N. caninum* depois que dois macacos rhesus (*Macaca mulatta*) foram infectados experimentalmente (ANDERSON et al., 1991). No entanto, não há evidências sólidas de que esse agente infecte seres humanos, porque somente baixos níveis de anticorpos têm sido relatados (ANDERSON; ANDRIANARIVO; CONRAD, 2000) e nem o DNA do parasito tem sido demonstrado em tecidos humanos. Não foram encontradas evidência de neosporose em mulheres que tiveram abortos espontâneos repetidos (ANDERSON et al., 1991).

Anticorpos para *N. caninum* foram encontrados na cidade de Uberlândia – Minas Gerais em 61 pacientes imunodeprimidos portadores do HIV 23 (38%), 50 com distúrbios neurológicos 9 (18%), 91 recém-nascidos 5 (5%) e 54 saudáveis 3 (6%). Em 61 pacientes infectados pelo HIV 20 (33%) estavam infectados tanto para

o *N. caninum* quanto para o *T. gondii*, dos 50 com distúrbios neurológicos 9 (18%) eram positivos para os dois parasitos, enquanto que dos 91 recém-nascidos 2 (2%) foram positivos para ambos e dos 50 pacientes saudáveis 2 (4%) também respondiam para ambos (LOBATO et al., 2006).

3.4 *Brucella canis*

A brucelose canina foi descrita pela primeira vez por Carmichael em 1966, EUA, durante episódios de abortamento em canis da raça Beagle, sendo isolada de tecidos fetais e placentários (HOLLET, 2006; KEID, 2006; GRAHAM; TAYLOR, 2012).

A Brucelose é uma doença infectocontagiosa, mundialmente disseminada, com caráter zoonótico, que atinge cães, bovinos, caprinos e ovinos causada por bactérias do gênero *Brucella* (ACHA; SZYFRES, 2003).

A *Brucella melitensis* atinge ovinos e caprinos causando infecções severas quando atinge o homem, enquanto a *Brucella abortus*, *Brucella suis, Brucella ovis, Brucella neotomae* e *Brucella canis* acometem bovinos e bubalinos; suínos; ovinos; roedores silvestres e cães, respectivamente (CARMICHAEL; GREENE, 1993; ACHA; SZYFRES, 2003;.KEID, 2006).

Os cães além da *B. canis* podem ser infectados por mais três dos seis espécies de *Brucella* conhecidas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*). A *B. abortus* pode infectar os cães quando estes ingerem tecidos de abortamento ou restos fetais de bovinos infectados, passando a hospedar e transmitir essa bactéria por meio de acasalamentos naturais e contatos oronasal por meio de fluidos e tecidos contaminados (HOLLET, 2006).

A infecção humana por *B. canis* foi constatada em 1969, após um acidente em laboratório e desde então tem sido considerada uma zoonose ocupacional (HOLLET, 2006; KEID, 2006). Estudos indicam que o homem deve ser exposto a um grande número de bactérias para que ocorra a infecção (HOLLET, 2006).

Sintomas clínicos em humanos acometidos por *B. canis* podem ser inespecíficos como hipertermia prolongada, fadiga, aumento do volume dos linfonodos, tosse, dores articulares, perda de peso, cefaleia, náuseas, mialgia e

depressão ou ainda portadores assintomáticos (KEID, 2006).

Em felinos domésticos a brucelose não representa uma causa expressiva de doenças reprodutivas (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

A *B. canis* é uma bactéria do gênero *Brucella*, intracelular facultativa, coco-bacilo, Gram-negativa, aeróbica, de crescimento lento, imóvel, bioquimicamente semelhante à *B. suis*, produtora de uréase, H_2S negativa, redutora de nitratos, não fermentadora e oxidade positiva, que tem o cão como seu hospedeiro e reservatório (KEID, 2006; GRAHAM; TAYLOR, 2012), possui propriedades antigênicas semelhantes a *B. ovis* (HOLLET, 2006).

A *B. canis* tem uma predileção pelo trato reprodutivo masculino e feminino em animais sexualmente maduros (GRAHAM; TAYLOR, 2012); e foi descrita uma predisposição dessa bactéria por animais jovens e sexualmente maduros, embora a doença possa ocorrer em todas as faixas etárias (HOLLET, 2006).

O modo de transmissão da *B. canis* ocorre por inalação, ingestão e inseminação desse patógeno, sendo o contato direto o principal modo de transmissão, pela via venérea, com alta probabilidade de propagação pelo grande número de bactérias eliminadas nas secreções reprodutivas (WANK; DELPINO; BALDI, 2006), sendo uma infecção sistêmica, de caráter crônico e bacteremia prolongada (KEID, 2006). A transmissão congênita também deve ser considerada, pois é por meio dela que filhotes adquirem a doença (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

No organismo, após a penetração da *B. canis* no hospedeiro, a bactéria é fagocitada por macrófagos e outras células fagocitárias, sobrevive e se multiplica no interior dessas células por onde atingem o sistema sanguíneo, sendo transportadas aos linfonodos regionais e estabelecendo a linfadenopatia periférica (KEID, 2006; VASCONCELOS et al., 2008). Essa bacteremia leva a *B. canis* para outros órgãos, preferencialmente os ricos em esteroides gonadais e em células reticuloendoteliais como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, útero gestantes, próstata, epidídimo e testículos (KEID, 2006; GRAHAM; TAYLOR, 2012), por até duas semanas pós-infecção e persistindo por pelo menos seis meses, sendo detectada por até 64 meses (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

Embora seja uma doença sistêmica, as manifestações clínicas caninas da brucelose são variadas, com predomínio de sintomas que atingem as funções

reprodutivas (orquite, epididimite, perdas embrionárias, abortos, atrofia testicular, dermatite de escroto, esterilidade), linfadenite, discoespondilite, hepato/esplenomegalia e uveíte (HOLLET, 2006; WANK, DELPINO; BALDI, 2006), sem descartar os portadores assintomáticos. A morte de filhotes fracos dentro de poucas horas após o nascimento assim como a presença de natimortos, tem sido relatada por alguns autores (KEID, 2006; GRAHAM; TAYLOR, 2012).

O diagnóstico da brucelose canina é importante, pois animais infectados constituem fontes de infecção, eliminam o agente no ambiente pela urina, por ejaculados, por secreções vaginais ou fetos abortados (BAEK et al., 2003). Existe uma necessidade de diagnósticos precisos tanto microbiológico quanto histopatológico ou sorológico de cães infectados com essa doença (MEGID et al., 2000).

Para o diagnóstico da brucelose canina são utilizadas provas sorológicas como o teste do antígeno acidificado tamponado ou soro aglutinação rápida (AAT), soro aglutinação rápida com 2-mercaptoetanol (ME), soro aglutinação lenta (SAL), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ELISA e fixação de complemento (FC) que utilizam antígenos de superfície bacteriana (KEID, 2006).

O AAT e a SAL têm sensibilidade e especificidade semelhantes e permitem a detecção de anticorpos entre quatro e oito semanas pós-infecção, com vantagem para o AAT que é uma prova fácil, rápida e bastante sensível (KEID, 2006). Os testes de ME, FC e AAT, em geral são usados como prova confirmatória da brucelose (AZEVEDO et al., 2003).

O cultivo bacteriano, embora seja laboroso, tem grande relevância, pois fornece um diagnóstico definitivo com o isolamento da *B. canis* (KEID et al., 2007; MEGID et al.,2008).

No Brasil, o teste de IDGA tem sido executado com o “kit” produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), no qual o antígeno é constituído por proteínas e lipopolissacarídeos extraídos da *Brucella ovis*, amostra Reo 198, padronizado por comparação com o antígeno de referência, apresentando resultados diagnósticos confiáveis (AZEVEDO et al., 2004).

A PCR constitui uma excelente técnica diagnóstica sendo um ensaio rápido, sensível e específico para *B. canis.* O DNA bacteriano é identificado por meio de

amostras positivas, demonstrando a presença do mesmo circulante nas secreções utilizadas para identificação (amostras de tecidos, urina, sangue, sêmen, descargas vaginais, linfonodos inguinais, humor aquoso etc) (FORBES, 1990; KEID et al.,2007; GRAHAM; TAYLOR, 2012).

A brucelose canina tem causado grande impacto no contexto de saúde pública, pelo aumento no número de descrições da doença no Brasil. Prejuízos atribuídos a essa doença em canis comerciais devem ser considerados, devido aos episódios de abortamento, infertilidade e perda do patrimônio genético (MEGID et al., 2000; KEID, 2006).

A prevenção da *B. canis* na criação de cães deve acontecer sempre, pois a disseminação da doença é rápida e por ser única forma de controle, visto que o tratamento é difícil, oneroso e pouco eficiente (KEID, 2006), sem esquecer o caráter zoonótico dessa doença.

3.5 *Leptospira* spp

A leptospirose é uma doença infecciosa distribuída mundialmente, representando um problema de saúde pública, considerada uma importante zoonose, muito frequente em países emergentes (MASCOLLI, 2010), tendo como agente etiológico bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (FAINE et al., 2000).

É uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, classificada como Spiroqueta, da família Leptospiracea (BERGEY et al., 1984), composta de um cilindro protoplasmático que se enrola ao redor de um filamento axial central e possui um envelope externo composto por lipopolissacarídeos e mucopeptídeos antigênicos (FAINE et al., 2000).

Água contaminada com urina, esgoto e esterco são importantes vias de transmissão da leptospirose (MASCOLLI, 2010). O verão é a estação do ano onde acontece o aumento da incidência de leptospirose, em decorrência de chuvas e alagamentos de áreas urbanas, sendo comum a ocorrência de surtos epidêmicos em épocas de maior precipitação pluviométrica (COIRO et al., 2011).

Os cães são considerados hospedeiros intermediários, reservatórios e animais sentinela de diversos sorovares, dentre eles o *canicola* que possui

incidência maior em animais não vacinados (GREENE, 1998; COIRO et al., 2011), embora os roedores são a fonte de infecção mais importante dessa doença, podendo exercer o papel de reservatório de Leptospiras mantendo o agente e disseminando-o por meio da urina no ambiente (BENGIS et al., 2004).

Um estudo no município de Botucatu avaliou um total de 1195 soros de cães, e encontrou uma expressiva porcentagem de animais reagentes para leptospira (20,8%) sendo encontradas as seguintes porcentagens e sorovares: *Canicola* (6,7%), *Copenhageni* (5,0%), *Icterohemorragiae* (2,9%), *Autumnalis* (2,9%), *Pyrogenes* (2,8%), *Hardjo* (2,0%), *Australis* (1,8%), *Bratislava* (1,6%), *Cynopteri* (1,4%), *Djasiman* (1,0%), *Pomona* (2,0%) e *Grippotyphosa* (1,3%). (LANGONI et al., 2008). Outro estudo relata que os sorovares encontrados com frequência são *icterohaemorrhagiae*, o *copenhageni* seguido do *canicola,* principalmente na região sudeste do Brasil (FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2009).

No Brasil e na maior parte do mundo, as sorovariedades *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* têm sido associadas com a leptospirose canina (COIRO et al., 2011) ou ainda a sorovariedade Bratislava (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

A infecção é transmitida pelo contato direto ou indireto da Leptospira, por meio da ingestão de material contaminado com a bactéria, penetração do agente pela solução de continuidade da pele, via transplacentária ou ainda contato venéreo (COIRO et al., 2011; GRAHAM; TAYLOR, 2012). Essa infecção leva a danos no fígado, rins e outros órgãos. Aspectos patogênicos da *Leptospira* sp. levam o agente a replicar-se ativamente em diferentes órgãos parenquimatosos, sangue, linfa e líquor, caracterizando o quadro agudo da doença, denominado leptospiremia (BOLIN, 1996). Esses anticorpos circulantes limitam normalmente a leptospiremia dentro de sete a 10 dias PI (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

Em humanos diagnosticados com leptospirose os achados clínicos encontrados são o mal estar geral, febre de início súbito, cefaléia, dores musculares e, em casos graves, alterações hepáticas, renais e vasculares. O modo principal de infecção é por exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados (MASCOLLI, 2010). Assim como a brucelose a leptospirose é uma doença incomum em gatos (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

Nos cães acometidos por essa patologia os sinais clínicos são variados,

manifestando desde formas agudas até formas crônicas e subclínicas (HAGIWARA et al., 2004). A leptospirose canina normalmente apresenta-se como uma enfermidade infectocontagiosa aguda e febril, pode ser acompanhada de manifestações entéricas, hepáticas e principalmente renais, além de hemorragias generalizadas (JULIANO et al., 2000).

Dependendo da sorovariedade infectante, os sinais clínicos podem ser vagos ou inaparentes, por exemplo, a leptospirose causada pela sorovariedade icterohaemorrhagiae provoca sintomas gastrointestinais, urinários e vasculares podendo levar ao comprometimento renal e hepático. Icterícia e lesões hemorrágicas são sintomas incomuns a infecções causadas por outros sorovares. A sorovariedade *canicola* desenvolve nos cães um grave comprometimento renal. (GREENE, 1998).

A leptospirose é um agente comumente envolvido em problemas reprodutivos, abortos e infertilidades (GREENE; CARMICHAEL, 2006). Febre e icterícia podem acompanhar ou preceder abortamentos, morte de neonatos, morte de recém-nascidos com poucas semanas de vida. Doenças reprodutivas têm sido descritas em canis e estão geralmente associadas à sorovariedade Bratislava (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

Dentre as modalidades de fonte de infecção da leptospirose, os portadores (convalescentes e sadios), excretores de leptospiras a quem se atribui a maior parcela de culpa pela persistência de focos da doença, são de suma importância (MASCOLLI et al., 2002).

Os cães são considerados uma importante fonte de infecção da leptospirose humana em áreas urbanas, pois vivem em estreito contato com o homem, eliminando leptospiras vivas pela urina durante vários meses, sem apresentar sinal clínico característico (GRAHAM; TAYLOR, 2012).

O diagnóstico da leptospirose dependente de uma boa história clínica, da vacinação, da disponibilidade de testes laboratoriais e de pessoal experiente. O sorodiagnóstico é realizado pelas técnicas de ELISA-IgM, e SAM, as técnicas moleculares englobam a PCR e os testes bacteriológicos ficam por conta do isolamento bacteriano (MASCOLLI, 2010).

A SAM, considerado pela Organização Mundial da Saúde como o método de

eleição para diagnóstico sorológico da leptospirose, apresenta alta sensibilidade e especificidade, aliado a simples execução e precocidade dos resultados (COIRO et al., 2011).

Antibióticos como penicilinas, estreptomicinas e doxiciclina tem sido utilizados atualmente. O tratamento com doxiciclina previne abortos e sobrecargas renais enquanto que a vacinação, contendo bacterinas específicas, previne doenças reprodutivas (MELO; MANHOSO, 2007; GRAHAM; TAYLOR, 2012).

3.6 *Ehrlichia canis*

A erliquiose monocítica canina é uma doença causada pelo agente etiológico *Ehrlichia canis* que tem representado expressiva ocorrência no Brasil.

O *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato marrom dos cães, é o vetor transmissor dessa e de outras doenças como *Anaplasma platys* e *Babesia canis*, capazes de produzir uma co-infecção muito comum entre estas e a *E. canis,* sendo que os três agentes causam trombocitopenia em cães domésticos (MACHADO, 2004; AGUIAR, 2006).

A *Ehrlichia spp* pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae. O gênero *Ehrlichia* inclui as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001; BREMER et al., 2005; MACHADO 2004).

As *Ehrlichias* são bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias que se replicam dentro de vacúolos das células hospedeiras, principalmente células hematopoiéticas maduras ou imaturas, do sistema mononuclear fagocitário (monócitos e macrófagos) e células endoteliais (BREMER et al., 2005; AGUIAR, 2006). O microorganismo *E. canis* pode ser visualizado no citoplasma de células sanguíneas mononucleares como colônias de corpos cocóides, denominadas mórulas intracitoplasmáticas (CESAR, 2008).

As espécies *E. canis*, *E.chaffeensis* e *E. ewingii* podem causar a infecção natural em cães, enquanto que para a *E. ruminantium* só existem relatos experimentais, e estes não descrevem anormalidades clínicas.(CESAR, 2008).

Estudos sorológicos e moleculares no Brasil têm avaliado a ocorrência de

diversas espécies de *Ehrlichias* em cães, gatos, animais selvagens e seres humanos, e a *E. canis* tem sido a mais encontrada (VIEIRA et al., 2011; AGUIAR, 2006).

Evidências sorológicas conferem a ocorrência de erliquiose granulocítica humana, causadas pelas espécies *Ehrlichia sennetsu* (“febre sennetsu”) e *Ehrlichia chaffeensis* mostrando que a erliquose não é apenas um problema médico veterinário (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). A erliquiose em humanos foi descrita pela primeira vez em 1987 e os sintomas clínicos apresentados foram hipertermia, mialgia, fraqueza e confusão mental (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001; AGUIAR, 2006).

As espécies de Erliquias que infectam felinos domésticos ainda não foram caracterizadas mas o material genômico de *E. canis* proveniente de gatos foi amplificado, clonado e sequenciado. Os vetores da erliquiose felina ainda não são conhecidos e supõe-se que a patogenia seja semelhante à da *E. canis,* com sintomatologia inespecífica, podendo ser causada por outra doença que esteja ocorrendo concomintantemente, como: letargia, febre, anorexia, perda de peso, esplenomegalia, linfadenomegalia e mucosas pálidas (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Em cães naturalmente infectados por *E. canis*, observa-se apatia, anorexia, diáteses hemorrágicas, poliúria e/ou polidipsia, ataxia, artrite, palidez de mucosas (ocular, oral e vulvar ou peniana), hipertermia, hepato e/ou esplenomegalia, uveíte anterior, opacidade de córnea, hifema e lesões coriorretinais focais (MACHADO, 2004). Secreção ocular e nasal, anorexia, depressão, perda de peso, linfadenopatia, vasculite, hemorragia secundária a trombocitopenia (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

Os achados hematológicos na erliquiose canina incluem anemia, trombocitopenia e leucopenia; redução acentuada nos valores do eritrograma (MACHADO, 2004; AGUIAR, 2006), hipergamaglobulinemia (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

O diagnóstico presuntivo da erliquiose monocítica canina é baseado no conjunto de alterações clínicas e hematológicas. Para o diagnóstico definitivo existem diversos testes sorológicos que incluem a RIFI e Western blotting, testes

moleculares como PCR, além de bacteriológicos, com o isolamento da *E. canis* (AGUIAR, 2006, CESAR, 2008).

A RIFI é o teste mais utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*E. canis*, mas ainda apresenta falhas, como o ponto de corte (1:40), que ainda não está bem definido. Estudos mostram que o teste sorológico de Western blotting tem uma boa correlação com a RIFI (≥ 40). Testes citológicos de sangue têm sido bastante utilizados na rotina clínica, mas apresentam um grande número de falsos negativos. A PCR vem sendo bem utilizada no diagnóstico da erliquiose canina, sensível e específica tem sido considerado o diagnóstica de eleição detectando o agente parasitário antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos da doença (MACHADO, 2004; AGUIAR, 2006; VIEIRA et al., 2011).

Para o tratamento da erliquiose canina é preconizada antibioticoterapia com tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e antiparasitários como o dipropionato de imidocarb. O uso de corticosteroides também está indicado para a preservação da integridade vascular ou função plaquetária, principalmente na fase crônica e grave da doença (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001; MACHADO, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi realizado sob a anuência e vigilância do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), aprovado em 09 de Dezembro de 2010, sob protocolo número 036/10.

4.2 Local do estudo

O presente estudo foi realizado em canis comerciais na microrregião de Ribeirão Preto e as análises laboratoriais executadas nas dependências do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal; Departamento de Microbiologia, IB, Campus de Botucatu; Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina – UEL; e Departamento de Biofísica e Bioquímica de Proteínas da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras (FFCLRP), da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto está localizada na região nordeste do Estado de São Paulo, com área de 650,916 Km^2, com temperatura média de 28°C, ventos de 11 Km/h, umidade de 62% e uma população média de 604.682 habitantes, com densidade demográfica de 928,92 habitantes/Km^2, sendo o bioma cerrado (IBGE 2011).

4.3 Delineamento Amostral

Para o cálculo do número de amostras foram considerados os seguintes parâmetros: prevalência esperada de 50% (utilizada para a maximização da amostra); erro amostral de 2,5% e grau de confiança de 95% (z=1,96) de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (THRUSFIELD, 2010):

$$n = \frac{p\,(1-p)\,Z^2}{d^2}$$

n: número de canis amostrados
p: prevalência esperada
z: grau confiança
d: erro amostral (ou erro de prevalência)

O tamanho da amostra foi corrigido conforme o tamanho da população por meio da seguinte fórmula (THRUSFIELD, 2010):

$$n_{cor} = \frac{N\,.\,n}{N+n}$$

n_{corr}: tamanho da amostra corrigido de acordo com o tamanho da população
N: tamanho da população

4.4 Animais

Foram colhidas amostras de sangue de 400 cães adultos e filhotes registrados no Kennel Clube de Ribeirão Preto, entidade filiada à Confederação Brasileira de Cinofilia, que mantem o serviço de Registro Genealógico (pedigree) de cães de raça pura. Essa população foi constituída por 108 machos e 292 fêmeas, com idade média 29,1± 8,9 (variação entre 04 a 72 meses), oriundos de canis comerciais, distribuídos na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, em um raio de 80 Km (Figura 1 e 2), sendo uma amostragem média de 50% dos animais de cada canil.

Para análise estatística foram considerados porte pequeno animais de até 10,0 Kg e porte grande aqueles com peso corporal maior (até 30 Kg). Raças dos cães, sexo, idade e porte de cada um estão no Anexo A.

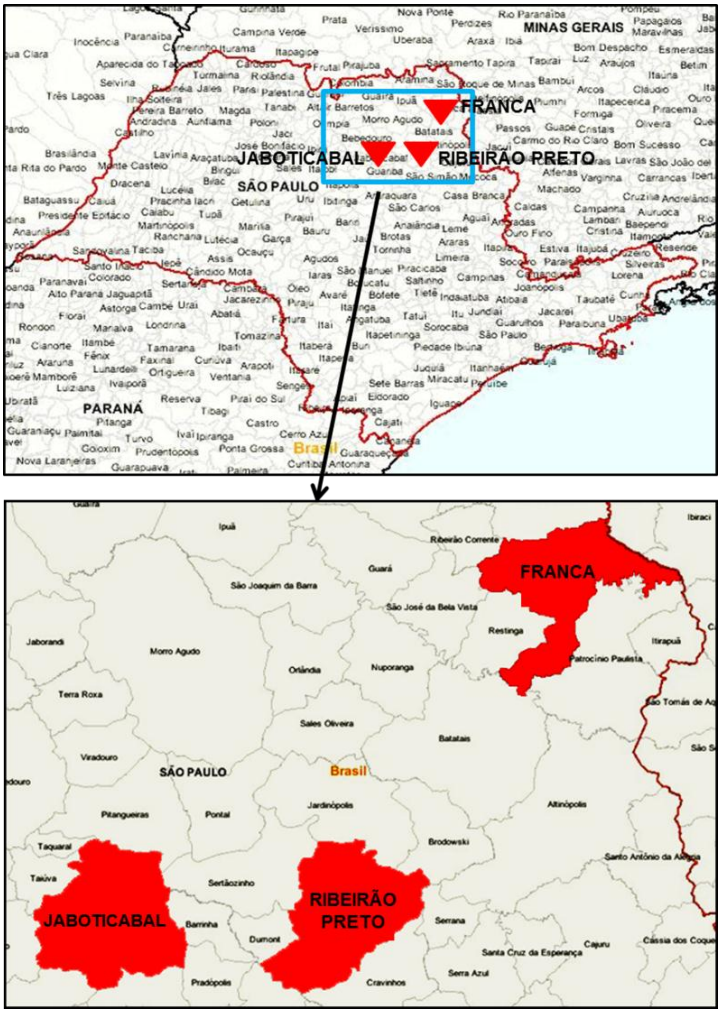


Figura 1. Georreferenciamento da região estudada

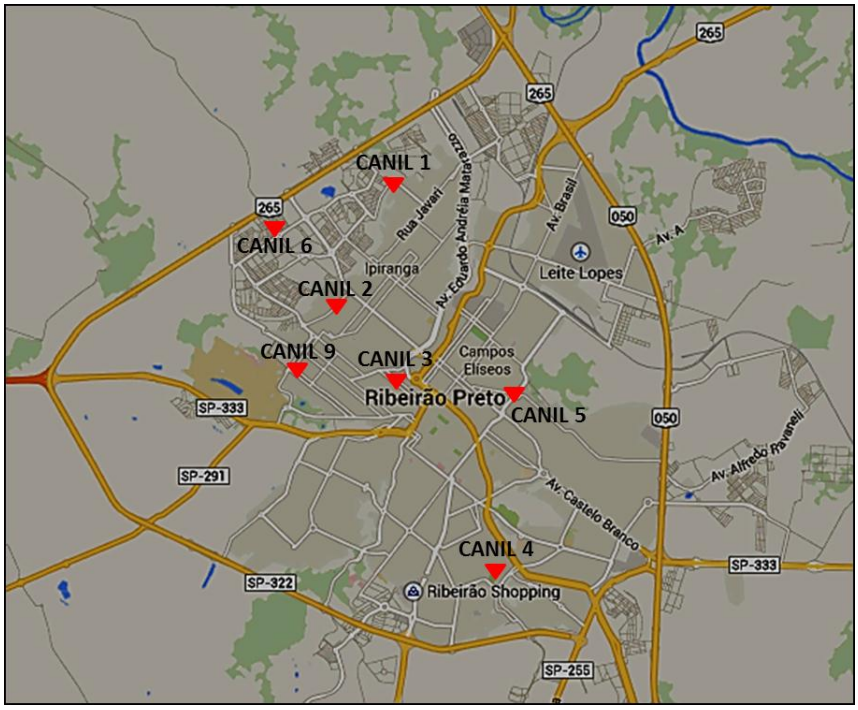


Figura 2. Georreferenciamento dos canis estudados no município de Ribeirão Preto.

4.5 Colheita e preparação das amostras

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular ou cefálica após assepsia do local. Foram colhidos 3 mL de sangue, separados em 2 tubos, 1 mL contendo EDTA 10%, para extração do DNA e 2 mL de sangue sem anticoagulante, para separação do soro.

O DNA foi extraído utilizando-se kit comercial (Wizard® Genomic Purification Kit, Promega, série 88094,18/11/2014, USA), segundo as recomendações do fabricante. As amostras de sangue foram armazenadas por no máximo 7 dias, a temperatura de 4ºC, anterior a extração. Para a extração, as amostras foram aliquotadas (300 µL) e combinadas com 900 µL de *Cell Lysis Solution* e 300 µL *Nuclei Lysis Solution*. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugada a 13.200 x g, durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL *Protein Precipitation Solution* e a mistura foi vigorosamente agitada por 20 segundos. Nova centrifugação (13.200 x g, por 3 minutos) foi realizada. O sobrenadante foi então transferido para outro microtubo

contendo 300 µL de isopropanol e a mistura foi agitada, centrifugada (13.200 x g, por 1 minutos) e o sobrenadante novamente descartado. Etanol 70% gelado (300 µL) foi adicionado ao microtubo e a solução novamente centrifugada (13.200 x g, por 1 minutos). O etanol foi aspirado e o tubo foi mantido aberto, em temperatura ambiente, para evaporação do etanol residual. A seguir, o DNA foi reidratado com 100 µL *DNA Rehydration Solution* e incubado em banho-maria, a temperatura de 65ºC, durante 1 hora. O DNA obtido foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Espectrofotômetro Thermo Scientific, Modelo Nano Drop 2000, série nº 6893, USA), em um comprimento de onda de 260 nm e sua pureza avaliada pela razão entre 260/280 nm. Foi considerada uma amostra de DNA válida quando a razão entre 260/280 nm foi próxima de 1,8. As amostras de DNA foram armazenadas a temperatura de -20ºC para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

O sangue colhido sem anticoagulante foi centrifugado a 1.000 x g, durante 10 minutos. O soro (sobrenadante) foi recolhido, aliquotado e armazenado a temperatura de -80ºC até a pesquisa de anticorpos.

4.6 Aplicação de Questionário

Para cada proprietário do canil foi aplicado em forma de entrevista, um questionário epidemiológico e reprodutivo para posterior confronto com resultados sorológicos e moleculares (Anexo B).

4.7 Testes sorológicos

4.7.1 T. gondii

Para o diagnóstico do *T. gondii* foi realizado o teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As lâminas contendo antígeno para RIFI foram preparadas anteriormente pelo laboratório de Protozoologia utilizando o protocolo de CAMARGO (1964), modificado.

A produção do antígeno para RIFI foi realizada pela inoculação de taquizoítos da cepa RH (SABIN, 1941) de *T. gondii* em seis camundongos suíços albinos (*Mus musculus*) (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os camundongos foram

eutanasiados 60 horas após a inoculação para colheita do exsudato peritoneal em tampão salina heparinizado (50 µL para 25 mL).

O exsudato foi centrifugado por 3 vezes, de 10 minutos a 450 x g e o sobrenadante descartado. As células no sedimento foram ressuspendidas em 1,0 mL de tampão salina estéril, acrescido de 100 µL de formol a 2%, para um volume final de 5,0 mL (tampão salina). Essa mistura foi transferida para um tubo tampado e incubada a uma temperatura de 37ºC por 30 minutos (agitada por inversão a cada 10 minutos). A seguir a solução foi centrifugada por 45 segundos, a 450 x g. Após isso o sobrenadante foi coletado desprezando o sedimento (células epiteliais).

A amostra foi novamente centrifugada por 3 vezes de 10 minutos cada, a 450 x g para a retirada do formol. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em tampão salina (1,0 mL).

O antígeno de *T. gondii* preparado foi colocado em câmara hematimétrica de Neubauer para contagem e cálculo da concentração. Foram adicionados 10 µL do antígeno em cada poço (impressos em lâminas de microscopia pela técnica de *silk screen*), contendo de 20 a 30 taquizoítos por campo, confirmados pela leitura em microscópio ótico, com aumento de 400x. As lâminas foram secas a temperatura ambiente (*overnight – 12 horas*), acondicionadas em papel absorvente ultrafino e papel alumínio, identificadas com o nome do antígeno e data, as quais foram congeladas a temperatura de -20ºC até o momento do uso.

Para a RIFI os soros sanguíneos dos cães para o teste foram descongelados a temperatura ambiente. As lâminas contendo antígeno de *T. gondii* foram aquecidas em estufa a temperatura de 37ºC em câmara úmida. O soro sanguíneo foi diluído (1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 e 1:4.096) em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2. Foram adicionados 10 µL de cada diluição em duplicata nos poços das lâminas, iniciando-se da maior diluição para a menor. Foram utilizados 2 poços como controle negativo e positivo. As lâminas foram incubadas em estufa a 37ºC, por 30 minutos. A seguir, foram retiradas da estufa e submetidas a três lavagens por imersão, de 10 minutos cada, em PBS pH 7,2. As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente até a secagem. O conjugado foi retirado do freezer e diluído a 1:500 [anti-IgG de cão conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), produzido em coelhos, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, BR] em PBS, pH 7,2 contendo 0,01% azul de Evans,

a fim de escurecer o fundo da lâmina e facilitar a identificação das amostras positivas. A cada poço foram adicionados 10µL do conjugado diluído e as mesmas foram incubadas em câmara úmida a temperatura de 37ºC por 30 minutos. Decorrido esse período, as lâminas foram novamente lavadas em solução de PBS pH 7,2, por 3 vezes de 10 minutos e secas em estufa. Ato contínuo, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada em carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,5 e recobertas com lamínula para avaliação em microscópio de epifluorescência (Olympus, Mod BX50-FLA, Japão), num aumento de 400X. Foram considerados positivos os soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:64 e nesta diluição as reações em que os taquizoítos apresentaram fluorescência periférica total (Figura 3) em no mínimo 50% dos parasitos.

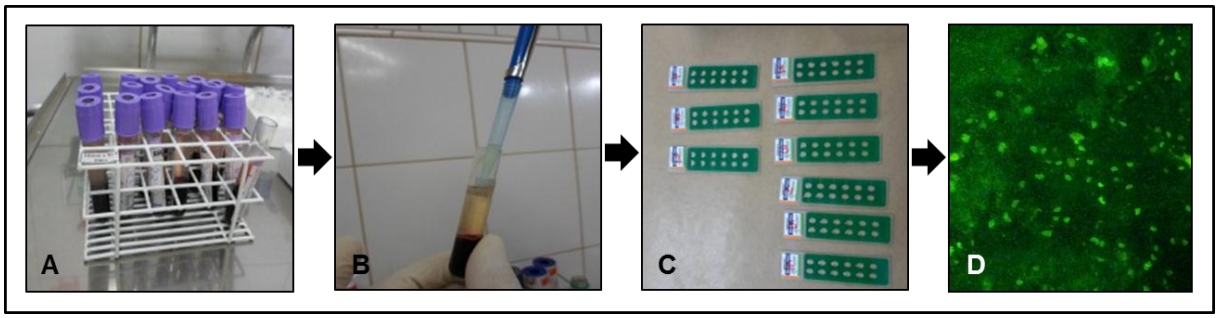


Figura 3. Fotografia da sequência da Reação de imunofluorescência indireta para T. gondii e N. caninum, respectivamente. A e B. Obtenção do soro. C. Lâmina preparadas para o teste. D. Resultados positivos avaliados em microscopia de epifluorescência.

4.7.2 N. caninum

Para a pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum*, no soro sanguíneo de cães suspeitos, foram adquiridas comercialmente (Imunodot ® diagnósticos, Lote: 031, Jaboticabal, SP, BR) lâminas contendo taquizoítos íntegros (antígeno) distribuídos em lâminas para imunofluorescência com 12 poços. As lâminas, contendo o substrato antigênico foram conservadas a temperatura de –20ºC até o momento do uso.

A imunofluorescência indireta (IFI) seguiu o mesmo protocolo de CONRAD et al. (1993). As lâminas foram descongeladas a temperatura ambiente e posteriormente aquecidas em estufa em câmara úmida a temperatura de 37ºC. As

amostras de soro sanguíneo foram diluídas (1:25) em tampão fosfato salina (PBS - 0,084 M Na_2HPO_4, 0,0018 M NaH_2PO_4, 0,147 M NaCl), pH 7,2 acrescida de 1% albumina sérica bovina (BSA) (m/v). A cada poço foi adicionado 10 µL da amostra diluída e cada lâmina continha um controle positivo e um negativo. A seguir, as lâminas foram incubadas por 40 minutos em estufa a temperatura de 37ºC e posteriormente lavadas por 3 vezes, de 5 minutos cada, em PBS, pH 9,0. As lâminas foram secas na temperatura ambiente. Adicionou-se, a cada poço, 10 µL do conjugado (anti-IgG de ovino, conjugado ao FITC, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, BR), diluído a 1:900 em PBS pH 7,2, acrescido de 1% BSA e 0,01% azul de Evans. As lâminas foram incubadas novamente, em câmara úmida a temperatura de 37ºC, por 40 minutos. Ato contínuo, as lâminas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, em PBS pH 9,0 e secas a temperatura de 37ºC, por 10 minutos. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada em carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,5 e recobertas com lamínula para avaliação em microscópio de epifluorescente (Olympus, Mod BX50-FLA, Japão), num aumento de 400X. As amostras foram consideradas positivas quando os taquizoítos apresentaram fluorescência periférica total (Figura 3) em no mínimo 50% dos parasitos.

4.7.3 B. canis

Para o diagnóstico da *Brucella canis* foi utilizado um kit comercial (*Anigen Rapid Canine Brucella Ab Test Bioeasy*, Partida 001/12, Bioeasy Diagnóstico, SA, Belo Horizonte, MG, BR) que utiliza a técnica de imunoensaio cromatográfico.

Os testes foram realizados adicionando-se 20 µL do soro sanguíneo no orifício do cassete e a seguir adicionou-se 4 gotas (160 µL) de tampão diluente, fornecido pelo kit. O cassete foi mantido sob repouso durante 20 minutos e os soros foram considerados positivos quando formou duas linhas sobre as letras T (linha de teste) e C (linha controle). Os soros negativos apresentaram somente a linha C marcada (Figura 4).



Figura 4. Fotografia do bioensaio para detecção de anticorpos contra Brucella canis. Letra **a** indica o resultado positivo e **b** o negativo para o teste.

4.7.4 Leptospira spp

Para o diagnóstico da leptospirose foi empregada a SAM, utilizando uma coleção de antígenos vivos que inclui 24 variantes sorológicas (sv) de leptospiras patogênicas (Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola, Whitcombi, Cinoptery, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot) e duas de leptospiras saprófitas (Andamana e Patoc), para a detecção de anticorpos das classes IgG e IgM contra *Leptospira* spp.

O soro sanguíneo teste foi diluído 1:50 em solução salina tamponada. Desta solução foram retirados 25 µL e adicionado igual quantidade de antígeno *Leptospira* spp sobre uma placa de polietileno de fundo plano, de acordo com Santa Rosa (1970). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à temperatura de 28ºC por uma hora e a leitura realizada em microscópio de campo escuro, diretamente na placa, com aumento de 100X. Foram considerados reagentes quando observado 50% (Figura 5) de aglutinação e então reexaminados em sete diluições seriadas de razão dois e selecionadas apenas as amostras com titulação mínima de 100 (ponto-de-corte).

Foram considerados positivos os animais que apresentaram reação positiva a pelo menos uma sorovariedade de *Leptospira* spp, independentemente da sorovariedade envolvida e de casos de coaglutinação.



Figura 5. Fotografia do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), mostrando resultado positivo para a sorovariedade Panama (800).

4.8 Testes moleculares

4.8.1 E. canis

Para detecção da *Ehrlichia canis* foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Polymerase Chain Reaction Real Time* – RT-qPCR) no Laboratório de Diagnóstico Molecular no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu.

A extração do DNA seguiu o protocolo descrito anteriormente para preparação das amostras. Após o descongelamento a temperatura ambiente, uma alíquota 4 µL de cada amostra de DNA extraído foi misturada a 10 µL *qPCR Master Mix* (2X) e 0,18 µL CXR Reference Dye 30 µM (ROX, Promega, cat. A6001/2, Lote 114301, USA), 0,2 µL de cada par de *primers* dirigido ao gene *Ehrlichia canis* (*forward* e *reverse*) e *Ehrlichia* spp (*forward*) (Quadro 1) e água livre de nucleases 5,22 µL qsp, volume final de 20 µL. Esta mistura foi colocada na placa de 96 poços (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil), selada com filme óptico e a qPCR foi executada utilizando-se o equipamento ABI 7300 (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil). As condições de reação foram divididas em 3 estágios, estágio 1, de desnaturação do DNA, foi executado a temperatura de 95ºC, durante 2 minutos. O estágio 2, de amplificação das fitas de DNA, foi executado à temperatura de 95ºC (5

segundos) e temperatura de 60ºC (34 segundos), repetidos por 50 ciclos. A temperatura de *melting* da curva de dissociação (estágio 3) esperada para as amostras positivas ocorreu num intervalo de temperatura de 80,3°C a 81,1°C. Os resultados foram analisados pelo programa 7500 software v2.0.6 (Life Technologies, Madison, WI, USA) e interpretado comparando-se com os controles positivos e negativos (Figura 6).

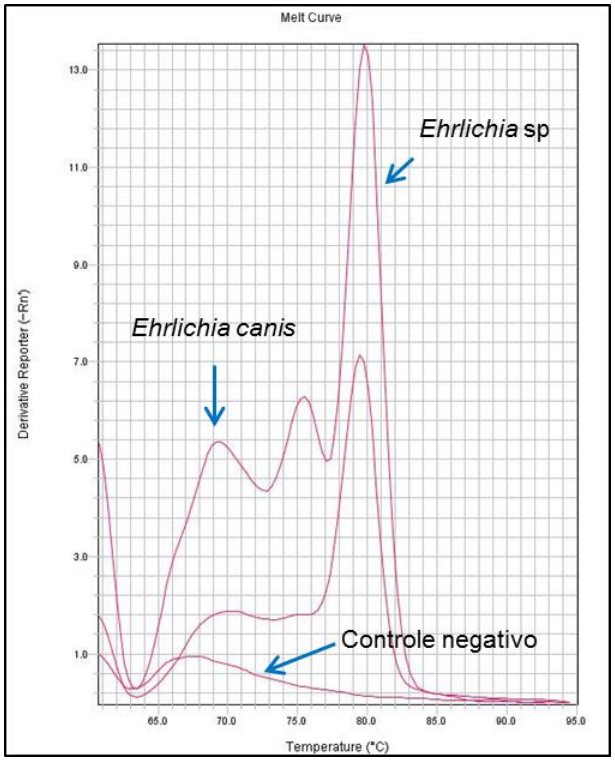


Figura 6. Demonstração da melting da curva de dissociação para *Ehlichia sp* e *Ehrlichia canis*. Note o controle negativo.

4.8.2 Herpesvírus canino

Para a detecção do CaHV-1 foi utilizado o par de *primers* descritos no Quadro 1. Utilizou-se uma alíquota 3 µL de cada amostra de DNA extraído, a qual foi misturada a 10 µL de *qPCR Master Mix* (2X), 0,18 µL de ROX 30 µM (Promega, cat. A6001/2, Lote 114301, USA) e 0,5 µL de dimetilsulfóxido 99,5% (DMSO Sigma-Aldrich, Lote BCBD 5259V, USA), 0,6 µL de cada par de *primers* dirigido ao gene Timidina quinase (*forward* e *reverse*) (Quadro 1) e 5.12 µL de água livre de nucleases q.s.p., com um volume final de 20 µL.

Esta mistura foi colocada na placa de 96 poços (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil), selada com filme óptico e a qPCR foi executada utilizando-se o equipamento ABI 7300 (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil). As condições de reação foram estágio 1, de desnaturação inicial a temperatura de 95ºC, durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de repetições a temperatura de 95ºC (30 segundos), 57ºC (30segundos) e 72°C (30 segundos). A temperatura de *Melting* da curva de dissociação esperada para as amostras positivas ocorreu num intervalo de 73°C a 76°C. Para os controles foram utilizados água livre de nucleases (controle negativo) e uma amostra de DNA animal positivo para herpesvírus canino tipo 1 (Figura 7), sequenciado no LDM do IB de Botucatu, UNESP – Campus Botucatu.

Quadro 1: Sequência de oligonucleotídeos dos genes utilizados para *qPCR Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* sp e Hespervírus canino.

Identificação	**Sequência de oligonucleotídeos (5'>3')**	**Referências**	**Nº acesso do gene**
Ehrlichia canis	*Foward primer (5'3')* TATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTGTTA	Baneth et al., 2009	KJ659037.1
	Reverse primer (3'5') ACCATTTCTAATGGCTATTCCGTACTA		
Ehrlichia sp	*Foward primer (5'3')* CTCAGAACGAACGCTGG	Sirigireddy e Ganta, 2005	KJ513197.1
Herpevírus canino	*Forward primer (5'3')* CGTGGTGAATTAAGCCTAA	Schulza & Baumgärtner, 1998	AF361075.1 X75765.1
	Reverse primer (3'5') ATGCTATTGGGTGTCTATC		

*GenBank, no www.ncbi.nlm.nih.gov

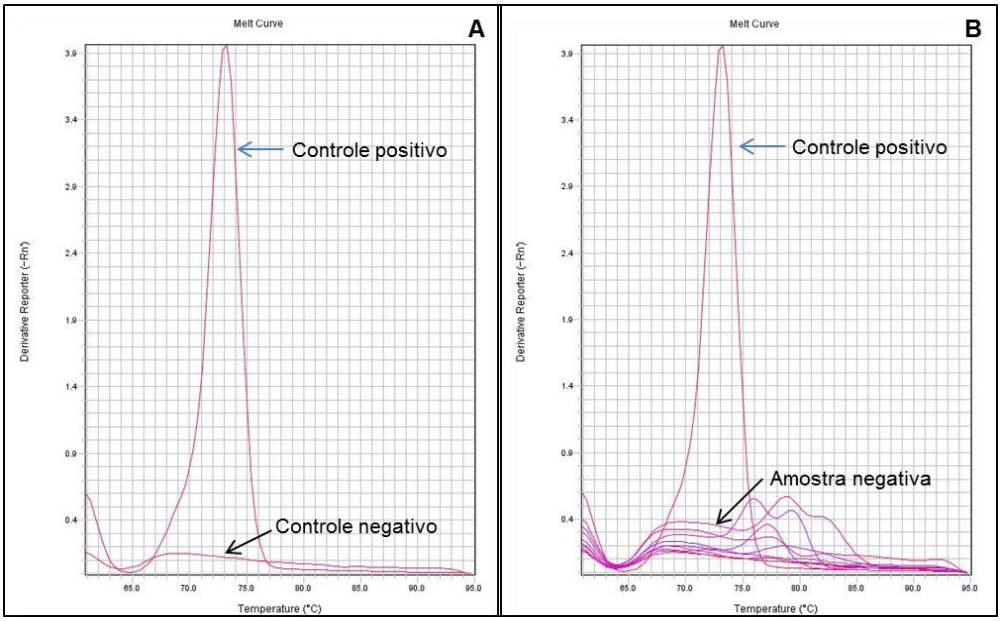


Figura 7. Demonstração da temperatura de *melting* da curva de dissociação para Herpesvírus canino. Note os controles positivo e negativo.

4.9 Análise dos dados

Todos os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram confrontados aos dados colhidos pelo histórico clínico e reprodutivo, obtidos no questionário epidemiológico (Anexo B).

A análise estatística empregada consistiu no tratamento descritivo geral dos resultados obtidos, com a determinação das estimativas de prevalência e cálculo do intervalo de confiança das taxas de doenças na microrregião de Ribeirão Preto, recomendada por Thrusfield (2010). Essa análise investigou o efeito simultâneo de vários fatores (doenças) em uma variável resposta (abortamento), onde acreditávamos que esses fatores pudessem estar relacionados.

Para verificar se as variáveis sexo, idade e raça estavam associados às infecções, foram realizadas as análises univariadas, com cálculo da razão de prevalência e de seu respectivo intervalo de confiança e teste de χ^2. Os cálculos foram realizados empregando o software Epi Info 7 [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA, 2014]. Para a análise inferencial foi considerado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Todos os gráficos foram montados em planilhas Excell.

5. RESULTADOS

O perfil dos 400 animais estudados na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, demonstrou uma população canina constituída por 108 machos (27,0%, IC95%: 22,65-31,35) e 292 fêmeas (73,0%; IC95%: 68,65-77,35), com faixa etária entre 4 – 72 meses, com predominância de animais adultos com idade de 24,0 meses de idade (13,5%; IC95%: 10,15-16,85). Todas as raças, sexo, idades e poret do animal estão descritas no Anexo A.

Todos os animais desse estudo (100%) eram alimentados exclusivamente com ração, sendo que a maioria recebeu ração do tipo *super premium*. Apenas um canil (11,1%; IC95%: 1,99-43,50), além da ração, fornecia carne de frango cozida. A ração era armazenada em baldes/tambores com tampa (88,9%; IC95%: 68,36-109,42) ou na própria embalagem vedada (11,1%; IC95%: 1,99-43,50), sem acesso de insetos ou roedores.

Os alimentos eram fornecidos em comedouros de plásticos (77,8%: IC95%: 50,62-104,94) e alumínio (22,2%; IC95%: 6,32-54,74), higienizados em sua maioria diariamente (55,5%; IC95%: 23,09-88,02), semanalmente (33,3%; IC95%: 2,53-64,13) ou três vezes por semana (11,1%; IC95%: 1,99-43,50), utilizando água e sabão (33,3%; IC95%: 2,53-64,13), cloro (22,2%; IC95%: 6,32-54,74), apenas água (22,2%; IC95%: 6,32-54,74) ou amônia quaternária (22,2%; IC95%: 6,32-54,74). A água era fornecida aos cães em bebedouros de plástico (55,5%; IC95%: 23,09-88,02) ou bebedouros de barro (44,4%; IC95%: 11,98-76,91), higienizados diariamente (55,5%; IC95%: 23,09-88,02) com água e sabão (55,5%; IC95%: 23,09-88,02).

Todos os canis desse estudo estavam localizados na zona urbana, sendo que alguns deles encontravam-se em bairros mais afastados. Os animais desses estabelecimentos (100%; IC95%: 100) não tinham livre acesso à rua e nem contato com outra espécie animal.

A estrutura física dos canis, em sua maioria, era de cimento/piso frio (66,67%; IC95%: 35,87-97,47), seguido de gramado (22,2%; IC95%: 6,32-54,74) ou terra (11,1%; IC95%: 1,99-43,50), sem telas para impedir a entrada de aves, morcegos ou

insetos. Em todos os estabelecimentos os cães eram alojados em grupos, geralmente do mesmo sexo. Em metade dos estabelecimentos foi observada a presença de roedores (ratos) e foram eliminados por meio de armadilhas (66,7%; IC95%: 35,87-97,47) ou controle natural (33,3%; IC95%: 2,53-64,13).

A limpeza dos canis era realizada em sua maioria com água sanitária (55,6%; IC95%: 23,09-88,02), seguida de cloro (33,3%; IC95%: 2,53-64,13) e amônia quaternária (22,22%; IC95%: 6,32-54,74). Grande parte dos canis (44,4%; IC95%: 11,98-76,91) não recebia visita de gatos e não alocava esta espécie nas propriedades.

Todos os animais receberam vacinação anual contra raiva (vacina anti-rábica) associada a uma polivalente, V10 (55,6%; IC95%: 23,09-88,02) ou V8 (44,4%; IC95%: 11,98-76,91). Apenas um canil realizava vacinação contra leptospirose (11,1%; IC95%: 1,99-43,50) e assim como as demais vacinas eram administradas anualmente.

A desverminação era realizada em todos os animais, com frequência variada de administração em quadrimestral (66,7%; IC95%: 35,87-97,47) ou semestral (33,3%; IC95%: 2,53-64,13). A maioria dos canis (77,8%; IC95%: 50,62-104,94) modificava o princípio ativo dos fármacos a cada desverminação e em nenhum era realizado o exame coproparasitológico antes do tratamento.

Nenhum dos canis fazia uso de anticoncepcional em seus animais.

A maioria (55,6%; IC95%: 23,9-88,02), dos cães de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto tinham acesso a animais de fora do plantel. Esse contato ocorreu em vista dos acasalamentos, sendo que 66,7% (IC95%: 35,87-97,47) dos animais saem do canil para reprodução *versus* 33,3% (IC95%: 2,53-64,13) de animais de fora do canil que entraram nesses canis com esse propósito. Nenhum deles tinha o cuidado de manter os encontros separados do restante dos animais e não realizavam exames prévios aos acasalamentos.

Animais adquiridos de outros criatórios passavam por quarentena em 66,7% (IC95%: 35,87-97,47) dos canis estudados. Esses novos animais permaneciam separados dos demais na casa dos proprietários (22,2%; IC95%: 6,32-54,74), em recintos dentro dos canis (22,2%; IC95%: 6,32-54,74) ou em instalações anexas (22,2%; IC95%: 6,32-54,74), por um período variável de uma semana (44,4%;

IC95%: 11,98-76,91), 45 dias (33,3%; IC95%: 2,53-64,13) ou até duas a três semanas (22,2%; IC95%: 6,32-54,74). Apenas 22,2% (IC95%: 6,32-54,74) dos canis não realizavam a quarentena de novos animais introduzidos no plantel.

O banho fazia parte da rotina de quase todos os canis avaliados (88,9%; IC95%: 68,36-109,42), apenas um canil (11,1%; IC95%: 1,99-43,50) não mantinha esse hábito de higiene. A frequência com que esses banhos ocorriam era quinzenal (77,8%; IC95%: 50,62-104,94) ou semanal (22,2%; IC95%: 6,32-54,74).

A *Leptospira* spp foi o patógeno de maior incidência nos estabelecimentos estudados, apresentando uma prevalência de 34% (IC95%: 29,53%-38,77%), seguido pelo *N. caninum* com 30,50% (IC95%: 26,19%-35,18%) (Figura 8), com uma variação entre os canis (Figura 9).

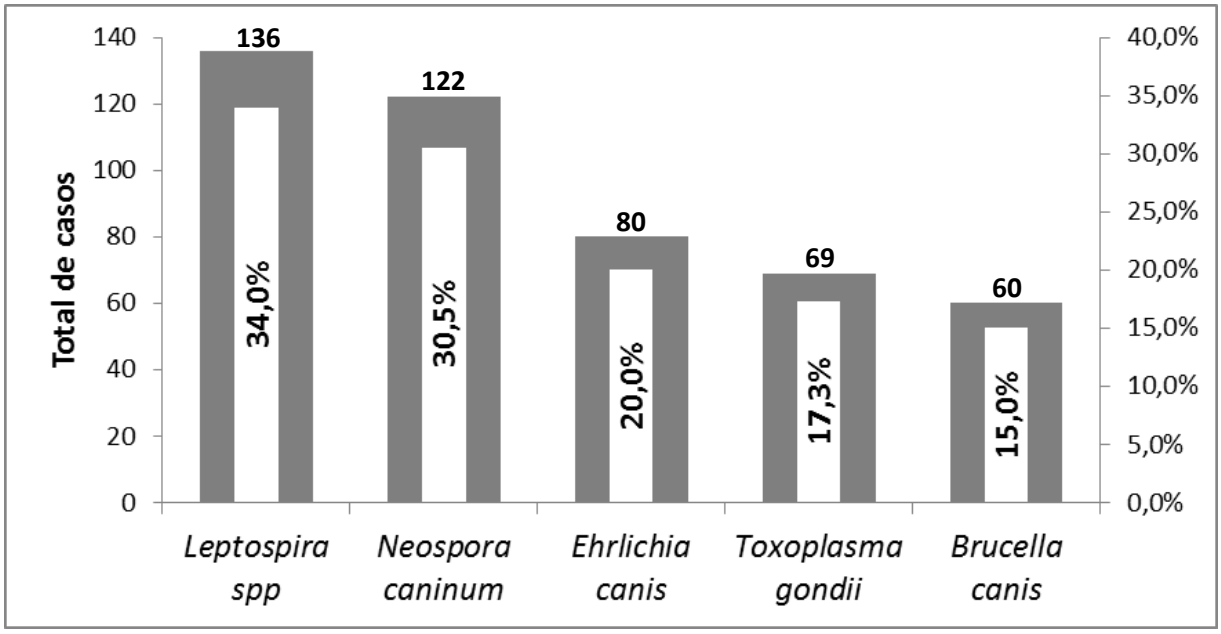


Figura 8. Número geral e porcentagem de casos positivos para os patógenos estudados em nove canis comerciais, na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, 2014.

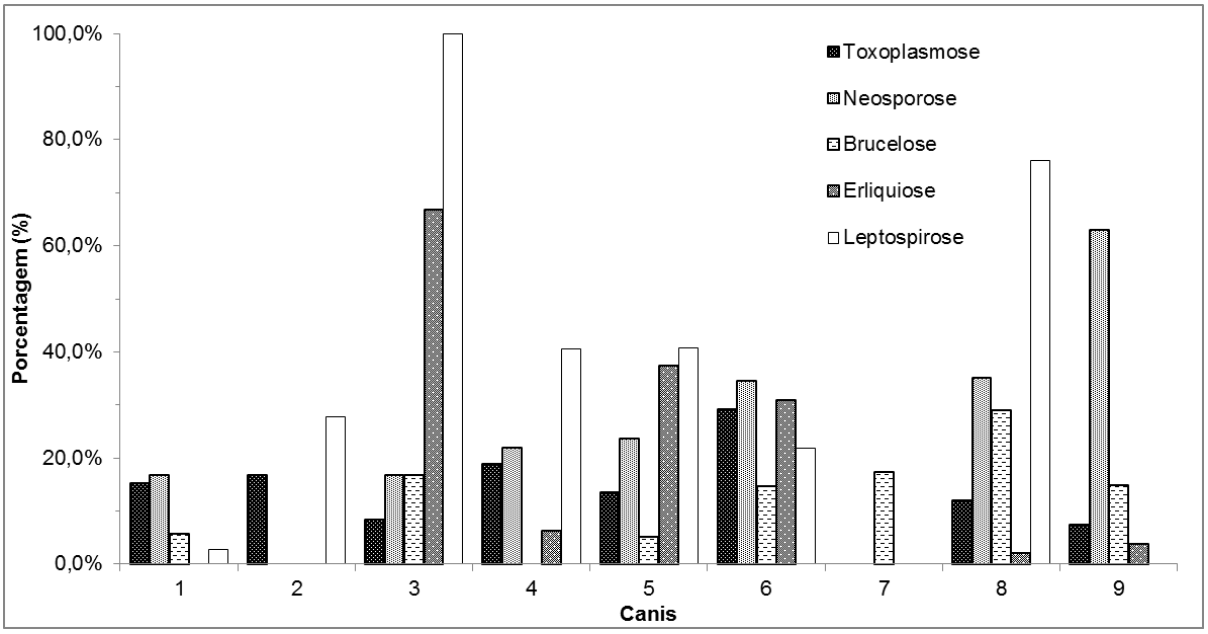


Figura 9. Porcentagem de casos positivos para os patógenos estudados em nove canis comerciais, na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, 2014.

Um canil (número 7) apresentou todas as amostras negativas tanto para *Leptospira* spp quanto para o *T. gondii* e dois canis (de números 2 e 4) foram negativos para a *B. canis* (Figura 9).

A sorovariedade panama da *Lepstospira* spp foi a mais prevalente com 44,12% (IC95%: 35,77%-52,46%), seguida da autmnalis 19,85% (IC95%: 13,15%-26,56%), canicola e copenhageni com 15,54% (IC95%: 9,37%-21,51%) e grippotyphosa com 13,97% (IC95%: 8,14%-19,80%), sendo as demais pouco expressadas nos canis estudados (Figura 10). Houve uma distribuição heterogênea das sorovariedades entre machos e fêmeas (Tabela 1).

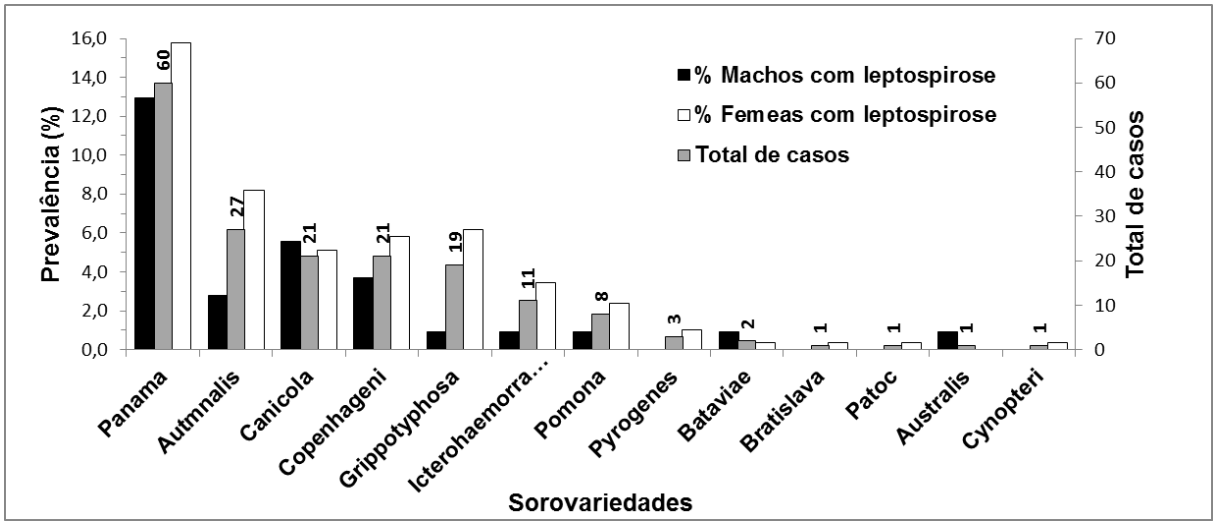


Figura 10. Soroprevalência de aglutininas anti–*Leptospira* spp em machos e fêmeas oriundos de canis comerciais, na microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, 2014.

Tabela 1- Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014.

Variável		Testado	Positivo	Prevalência*	IC95%	P	Razão de prevalência
Sexo	Fêmea	292	104	35,62	30,12-41,11	0,36882	0,86 (0,64-1,15)
	Macho	108	32	29,63	21,02-38,24		
Idade	Adulto	393	135	34,35	29,66-39,05	0,47872	2,40 (0,39-14,84)
	Filhotes	07	01	14,29	2,57-51,31		
Porte	Pequeno	353	129	36,54	31,52-41,57	0,00544	2,45 (1,22-4,93)
	Grande	47	07	14,89	4,72-25,07		

IC = intervalo de confiança

Ao verificar se os fatores sexo, idade e porte estavam associados ao risco de infecção por *Brucella canis* nenhum fator mostrou-se associado (Tabela 2).

Tabela 2 - Prevalência de *B. canis* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014.

Variável		Testado	Positivo	Prevalência*	IC95%	P	Razão de prevalência
Sexo	Fêmea	292	44	15,07	10,97-19,17	0,92462	1,02 (0,60-1,72)
	Macho	108	16	14,81	8,11-21,51		
Idade	Adulto	393	135	34,35	29,66-39,05	0,55697	-
	Filhotes	07	01	14,29	2,57-51,31		
Porte	Pequeno	353	129	36,54	31,52-41,57	0,84485	0,87 (0,44-1,70)
	Grande	47	07	14,89	4,72-25,07		

IC = intervalo de confiança

Associando-se os fatores sexo, idade e porte ao risco de infecção por *Toxoplasma gondii* não foi observada associação significativa com nenhum dos fatores (Tabela 3).

Tabela 3 - Prevalência de *T. gondii* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014.

Variável		Testado	Positivo	Prevalência*	IC95%	P	Razão de prevalência
Sexo	Fêmea	292	53	18,15	13,73-22,57	0,52547	1,23 (0,73-2,05)
	Macho	108	16	14,81	8,11-21,51		
Idade	Adulto	393	69	17,56	13,80-21,32	0,76783	1,21 (0,19-7,53)
	Filhotes	07	0	0	0		
Porte	Pequeno	353	57	16,25	12,31-19,99	0,16324	0,63 (0,37-1,09)
	Grande	47	12	25,53	13,07-38,00		

IC = intervalo de confiança

Ao avaliar se os fatores sexo, idade e porte do animal estavam associados ao risco de infecção por *Neospora caninum* observou-se associação entre a variável sexo e a frequência da infecção sendo fêmeas mais suscetíveis a infecção e machos menos propensos (Tabela 4).

Tabela 4 - Prevalência de *N. caninum* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014.

Variável		Testado	Positivo	Prevalência*	IC95%	P	Razão de prevalência
Sexo	Fêmea	292	77	26,37	21,32-31,42	0,00468	0,63 (0,47-0,85)
	Macho	108	45	14,81	8,11-21,51		
Idade	Adulto	393	122	31,04	26,47-35,62	0,17569	-
	Filhotes	07	0	0	0		
Porte	Pequeno	353	107	30,31	25,52-35,11	0,46530	0,82 (0,54-1,24)
	Grande	47	15	31,91	18,59-45,24		

IC = intervalo de confiança

Quando os fatores idade, sexo e porte dos animais forma avaliados junto ao riso de infecção por *Ehrlichia* foi observada uma associação entre o porte dos animais e a ocorrência da infecção. Sendo os animais de grande porte mais suscetíveis à infecção e animais de pequeno porte menos propensos (Tabela 5).

Tabela 5 - Prevalência de *Ehrlichia* em 400 cães machos e fêmeas oriundos de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, 2014.

Variável		Testado	Positivo	Prevalência	IC95%	P	Razão de prevalência
Sexo	Fêmea	292	57	19,52	14,97-24,07	0,79995	0,92 (0,60-1,41)
	Macho	108	23	21,30	13,57-29,02		
Idade	Adulto	393	79	20,10	16,14-24,06	0,92405	1,41 (0,23-8,73)
	Filhotes	07	1	14,29	2,57-51,31		
Porte	Pequeno	353	64	18,13	14,11-22,15	0,017890	0,53 (0,34-0,84)
	Grande	47	16	34,04	20,50-47,59		

IC = intervalo de confiança

Todos os nove canis estudados apresentaram casos de natimortos e abortamentos (Figura 11).

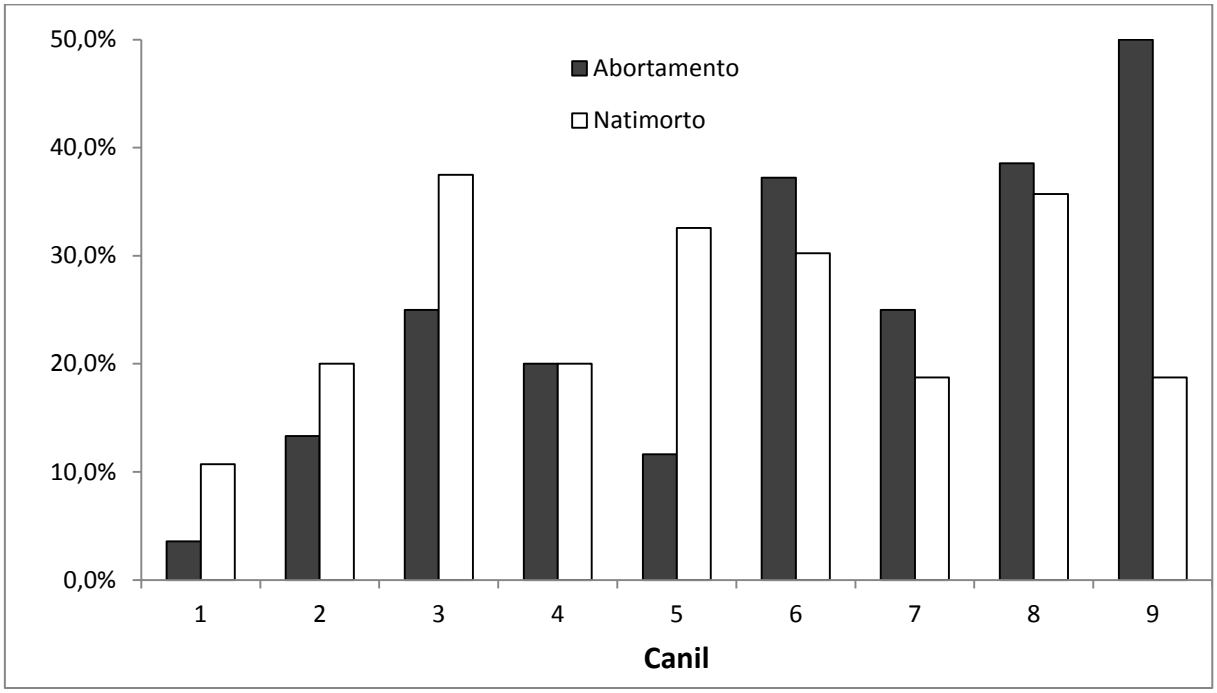


Figura 11. Porcentagem de abortamentos e natimortos nos 9 canis comerciais estudados.

Quando a variável dependente abortamento foi avaliada observou-se associação significativa com as infecções por *T. gondii* (p= 0,004260) *e B. canis* (p=0,0000012).

Ao avaliar a frequência de natimortos frente as infecções observou-se associação entre a frequência de natimortos e infecção por *Leptospira* spp (p=0,0058), *B. canis* (p=0,1 x 10^{-10}) e *T. gondii* (p=0,01034).

6. DISCUSSÃO

A *Leptospira* spp foi o patógeno de maior prevalência nos canis estudados (34%; IC95%: 29,53%-38,77%), seguido pelo *N. caninum (*30,50%; IC95%: 26,19%-35,18%), *E. canis* 20%; IC95%: 16,08-23,92), *T. gondii* (17,3%; IC95%: 13,55-20,95) e *Brucella canis* (15,0%; IC95%: 11,50-18,50). Esse resultado difere do encontrado no estudo de Coiro et al. (2011), que obtiveram dentre as enfermidades estudadas a t*oxoplasmose* (20,8%), leptospirose (7,6%), neosporose (1,98%) e nenhum caso positivo para leishmaniose.

A soroprevalência de aglutininas anti–*Leptospira* spp encontradas em nosso estudo foram panama (44,12%; IC95%: 35,77-52,46), autmnalis (19,85%: IC95%: 13,15-26,56), canicola e copenhageni ambas com a mesma prevalência (15,44%; IC95%: 9,37-21,51) e grippotyphosa (13,97%; IC95%: 8,14%-19,80%). Esses resultados também diferem dos de Coiro et al. (2011), que descrevem os sorovares canicola (65,2%), pyrogenes (17,4%), hardjo e djasiman ambas com 8,7%.

O estudo de Mascolli et al. (2002), mostra um resultado com os sorovares copenhageni (21%), canicola e hardjo (20%), pyrogenes e autmnalis (12%), grippotyphosa (8%) e castellonis (4%). Esses achados são diferentes tanto dos nossos resultados quanto dos encontrados no estudo de Coiro et al. (2011).

Essa diferença de sorovares entre os estudos pode estar relacionada com o local onde foram realizados, pois embora os três tenham sido feitos no Estado de São Paulo, os locais são diferentes (Ribeirão Preto, Botucatu e Santana de

Parnaíba).

Ressaltamos ainda que os sorovares icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa e pomona, fazem parte das vacinas polivalentes (V10) administradas em cães e que nosso estudo teve o cuidado de não coletar amostras de cães expostos a esse imunógeno há pelo menos 4 meses.

Embora tenha havido uma distribuição heterogênea entre machos e fêmeas infectados pela *Leptospira* spp a análise estatística dos dados não mostrou diferença significativa entre os diferentes sexos (p=0,36882); O mesmo ocorreu para relação entre idades (animais jovens e adultos), não mostrando diferença estatística (p= 0,47872). Esses achados corrobam em parte com os apresentados por Mascolli et al. (2002), que não encontraram diferença significativa, quando avaliaram esse patógeno e o sexo dos animais, mas diferente quando avalia a idade dos animais, mostrando p>0,05, nos animais com idade entre 1 e 4 anos.

Quando avaliado o porte dos animais, a análise univariada mostrou uma associação entre a frequência da infecção e o pequeno porte dos animais (p=0,00544). Podemos sugerir que esse resultado significativo esteja associado ao modo de alimentação dos animais. Em geral, cães de porte grande desse estudo eram alimentados uma vez ao dia, comendo toda a ração no momento em que a mesma era servida, enquanto cães de porte pequeno tinham suas vasilhas repletas de ração e como não comiam de uma vez só, dava margem à visita de roedores (ratos) que transmitem a leptospirose.

O patógeno *B. canis* foi detectado em 60 dos 400 animais avaliados representando 15% (IC95%: 11,50-18,50). Esse número mostrou-se baixo frente às demais infecções estudadas, mas semelhante aos resultados achados por Amarante e Silva et al. (2012) que observou a presença de *B. canis* em 79 dos 329 animais estudados (24,1%; IC95%: 19,7-29,0).

Ao verificar se os fatores sexo e raça estavam associados ao risco de infecção por *Brucella canis* nenhum fator mostrou-se associado, o que concorda com os achados de Amarante e Silva et al. (2012). Quando a variável idade foi associada à *Brucella*, também não foi observada associação significativa, embora 98,3% (IC95%: 99,96-99,54) dos animais estudados eram adultos. Esses resultados concordam com os achados de Azevedo et al. (2003), Porto et al. (2008) e Amarante

e Silva et al. (2012), que também não observaram associação entre infecção por *Brucella canis* e idade.

Para detecção da *Brucella canis* foram utilizados “kits” comerciais (Anigen rapid Canine *Brucella* AB Test Bioeasy), que apresenta 90% de sensibilidade e 90,1% de especificidade segundo o fabricante. Porto et al. (2008) e Cavalcanti et al. (2006) também utilizaram “kits”comerciais para triagem e relatam que os mesmos são satisfatórios para tal. Keid et al. (2001) e Azevedo et al. (2004) realizaram contra provas (testes 2-ME) para comparar os resultados aos encontrados pelo “kit” e relatam que os testes são uma opção podendo ser tão confiáveis quanto os tradicionais métodos (AAT, 2-ME e SAL) embora menos trabalhoso.

Quando o abortamento foi associado a *B. canis* foi possível observar uma associação (p = 0,0000012). Confirmando nossos resultados o estudo de Megid et al. (1999), observaram abortos e descargas vaginais em cadelas infectadas com *B. canis*. Esses achados são diferentes dos de Azevedo et al. (2003) que em uma prevalência de 2,2% (IC95%: 1,1-4,13) de *B. canis*, não observou transtornos reprodutivos nos cães estudados.

Infecção por *T. gondii* foi detectada em 69 dos 400 cães avaliados (17,3%; IC95%: 13,55-20,95). Embora estudos de toxoplasmose em cães sejam pontuais a ocorrência alta desse agente observada em nosso estudo, concorda com os achados de Mascolli (2010).

Todos os animais desse estudo (100%) eram alimentados exclusivamente com ração, sendo que a maioria recebeu ração do tipo *super premium*. Apenas um canil (11,1%; IC95%: 1,99-43,50) além da ração fornecia carne aos animais (carne de frango cozida). Os estudos de Brito et al. (2002) e Silva et al (2010) associam a ocorrência de toxoplasmose ao consumo de alimentação caseira, carne crua ou mal passada. Infelizmente esses resultados não podem ser comparados aos nossos, visto que apenas fornecia carne de frango cozida aos animais e apenas um canil (número 7) foi negativo para esse agente.

Embora nosso estudo tenha observado uma prevalência de animais doentes na faixa etária de 24 a 36 meses de idade, não houve uma relação entre risco da infecção e idade. Esses resultados concordam com os resultados de Silva et al (2010), que não observaram diferença entre as diferentes faixas etárias e discordam

de Brito et al (2002) que relatam uma prevalência da toxoplasmose em animais mais idosos.

Ao avaliar se os fatores sexo e raça estavam associados ao risco de infecção por *T. gondii* não foi observada associação com nenhum dos fatores, assim como no estudo de Ishizuka e Yasuda (1981), que também não encontraram diferença significativa entre as estações do ano e localização, afirmando que ambos têm a mesma chance de contágio. Já o estudo de Coiro et al. (2011) contradizem os anteriores e mostram uma infecção em cadelas de 1.6 vezes maior que nos machos.

Quanto à presença de roedores no local, não foi possível associar a toxoplasmose a esse evento, visto que alguns canis desse estudo que não relataram a presença de roedores apresentaram animais doentes, do mesmo modo que os locais onde havia a presença de ratos, esses resultados concordam com os encontrados nos estudos de Silva et al (2010) e Bresciani et al. (2008).

Quando comparada a variável dependente abortamento em associação a infecção pelo *T. gondii* observou-se uma significância mostrando que o parasito é responsável/causa de abortamento em cães (p = 0,004260). Os estudos de Bresciani et al. (2001) e Bresciani et al. (1999), confirmam esses achados mostrando que cadelas infectadas experimentalmente com o *T. gondii* apresentaram desordens reprodutivas como abortamento, morte fetal e ainda parto prematuro.

O parasito *N. caninum* foi encontrado em 122 dos 400 cães estudados (30,5%; IC95%: 25,99-35,01), uma prevalência alta, diferente dos resultados relatados em outros estudos, onde a prevalência em animais da zona urbana é baixa segundo Coiro et al. (2011).

A idade dos animais e o porte foram associados com o risco da infecção por *N. caninum* e não mostraram associação

Quando avaliado o fator sexo e o risco de neosporose, foi observada associação, sendo as fêmeas mais susceptíveis (p=0,00468) que os machos. Esses achados também foram observados por Coiro et al. (2011), onde houve uma prevalência de fêmeas não castradas e adultas e discordam dos resultados de Bresciani et al. (2008), que não observaram associação ao sexo do animal.

Nosso estudo não observou associação do *N. caninum* com alimentação, diferente de Bresciani et al. (2008), que associaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* com o fornecimento de alimentação caseira (p=0,006).

A idade e porte do animal não foram associados ao risco de infecção por *N. caninum*, assim como relatado por Coiro et al. (2011). Todos os animais do nosso estudo eram assintomáticos para todas as doenças estudadas o mesmo foi observado no estudo de Teixeira et al. (2006), que encontrou uma prevalência de 45% de animais doentes sem sintomatologia clínica.

O agente *E. canis* foi observado em 80 dos 400 animais estudados (20,0%; IC95%: 16,08-23,92), número pequeno quando comparado aos estudo de Aguiar (2006) que encontrou uma prevalência de 98% de *E. canis* e Silva et al. (2010) que encontrou 42,5%.

Quando relacionamos os fatores idade, sexo e porte dos animais ao risco de infecção por *Ehrlichia*, foi possível observar uma associação entre o porte dos animais e a ocorrência da infecção (p=0,017890), mostrando que os animais de grande porte são mais suscetíveis à infecção que animais de pequeno.

Houve relação significativa entre idade e erliquiose, quanto mais velhos os animais, mais susceptíveis à doença (p=0,006), mas não foi observada diferença significativa quando comparada a variável sexo segundo Aguiar et al. (2007). Já no estudo de Silva et al. (2010) não foram observadas associação significativa (p > 0,05) entre o resultado sorológico e nenhuma das variáveis estudadas: sexo, faixa etária e acesso à rua ou à zona rural e raças.

Todas as amostras foram negativas para o herpesvírus canino, embora tenhamos utilizado a técnica de PCR.

Diferente dos nossos achados, Santos (2014) encontrou uma prevalência de 10% de CaHV-1, nas amostras avaliadas, na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Esses resultados confirmam a presença do CaHV-1 em território nacional, conforme suspeitávamos inicialmente.

Para detecção do CaHV-1 Santos (2014) utilizou amostras de urina, swabs ocular e vaginal, dos quais extraiu o DNA e posteriormente realizou a técnica de PCR utilizando o primer forward (CCTAAACCTACTTCGATGA) e o reverse (GGCTTTAAATGAACTT-CTCTGG) (*Invitrogen*®). Em nosso estudo foram utilizados

os Forward primer (5’3’) CGTGGTGAATTAAGCCTAA e Reverse primer (3’5’) ATGCTATTGGGTGTCTATC, conforme arquivado no *GenBank*.

Ao avaliar a frequência de natimortos frente às infecções observou-se associação entre a frequência de natimortos e infecção por *Leptospira* spp (p=0,0058), *B. canis* (p=0,1 x 10^{-10}) e *T. gondii* (p=0,01034). Além desses agentes serem causadores de transtornos reprodutivos em cães, não se deve esquecer que todos são zoonoses e, portanto representam ainda um sério problema na saúde pública, visto que cães são animais estreitamente próximos dos humanos e poucas são as informações da transmissibilidade desses parasitos aos seres humanos.

7. CONCLUSÕES

Por meio desse estudo foi possível concluir que tanto a *B. canis* quanto o *T. gondii* são parasitos capazes de provocar abortamento em canis, e, portanto devem ser tomados cuidados profiláticos para que esses agentes não entrem em estabelecimentos comerciais, pois ambos são responsáveis por perdas que causa prejuízos aos proprietários.

O agente *Leptospira* spp, assim como a *B. canis* e o *T. gondii,* também acarreta em prejuízos em canis comerciais, visto a associação desse agente à morte de neonatos.

Sugerimos uma maior investigação desses agentes em programas de saúde pública.

8. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington, D.C.: OPS Organización Panamericana de la Salud, 3 vol. (Publicación Científica y Técnica No. 580), p. 28-55, 2003.

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. 2006. 96f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2006.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural,** v. 37, p. 796-802, 2007.

ALBERT, D. M.; LAHAV, M.; CARMICHAEL, L. E.; THIRTY, D. H. Canine herpes-induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Abril, v. 15, n. 4, p. 267-278, 1976.

AMARANTE e SILVA, C. P.; ALMEIDA, A. B. P.; GODOY, I.; ARAÚJO, A. C. P.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F.; NAKAZAKO, L.; DUTRA, V. Detecção molecular da Brucella canis em cães do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1051-1056, 2012.

ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*–like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaka, NY, v. 198, p. 241-244, 1991.

ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Toxoplasmose: uma zoonose-realidades e riscos. **Revista cães e Gatos**, n. 79, ano 13, nov/dez, 1998.

AZEVEDO, S.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M. P. S.; MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 156-160, 2003.

AZEVEDO, S.; VASCONCELLOS, S. A.; KEID, L. B.; GRASSO, L, M. P. S.; PINHEIRO, S.R.; MASCOLLI, R.; ALVES, C. J. Comparação de três testes

sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis.* **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 106-112, 2004.

BAEK, B. K.; LIM, C. W.; RAHMAN, M. S.; C-HYUN, KIM.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. Brucella abortus infection in indigenous Korean dogs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 312-314, 2003.

BARBER JS. Neosporosis canina. **Waltham Focus**, v. 8, p. 25-29, 1998.

BATISTA, C. S. A. **Avaliação epidemiológica de agentes infecciosos e parasitários da esfera reprodutiva em caprinos leiteiros do semiárido da Paraíba.** 2012. 87f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

BENGIS, R. G.; LEIGHTON, F. A.; FISCHER, J. R.; ARTOIS, M.; MÖRNER, T.; TATE, C. M. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics),** v. 23, n. 2, p. 497-511, 2004.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeithschrifft Fuer Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; HOLMDAHL, O. J.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to Neospora caninum in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 251-260, 1997.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of Neospora caninum infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P.; PINTO, L. S.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F.; BERNE, M. E. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of Neospora caninum antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 33-38, 2011.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J. J.; WAGNER, E. R.; EWING, S. A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D. L.; STICHA, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus. **Veterinary Parasitology,** v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.

BRESCIANI, K. D. S.; TONIOLLO, G. H.; COSTA, A. J.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1039-43, 2001.

BRESCIANI, K. D. S. **Estudo da reinfecção por *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) em cadelas gestantes naturalmente infectadas.** 2003. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2003.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; TONIOLLO, G. H.; KANAMURA, C. T.; LUVIZZOTO, M. C. R.; MORAIS, F. R.; PERRI, S. H. V. Transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii* em cadelas gestantes reinfectadas. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 13., 2004, Ouro Preto. **Anais...**Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. p. 214.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; NAVARRO, I. T.; TONIOLLO, G. H.; SAKAMOTO, C. A. M.; ARANTES, T. P.; GENNARI, S. M. Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 189-202, jan./mar. 2008a.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; NUNES, C. M.; SERRANO,A. C. M.; MOURA, A. B.; STOBRE, N. S.; PERRI, S. H. V.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos contra Neospora caninum e Toxoplasma gondii e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 1, 2008b.

BRITO, A. F.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz,** v.97, p.1-5, 2002.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 117-118, 1964.

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, G. E. **Brucelosis canina.** In: GREENE, G. E. Enfermedades infecciosas perros y gatos. México: Interamericana Mc Graw Hill, 1993. Sec. III, Cap. 52, p. 604-616.

CAVALCANTE, A. C. R.; CARNEIRO, M.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; VITOR, R. W. A. Risk factors for infection by Toxoplasma gondii in herds of goats in Ceará, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 60, n. 1, p. 36-41, 2011.

CAVALCANTI, L. A.; DASSO, M. G.; OLIVEIRA, F. C. S.; VIEGAS, S. A. R. A.; ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALCANTARA, A. C.; BITTENCOURT, D. V. V.; OLIVEIRA, E. M. D. Pesquisa de anticorpos anti-brucella canis em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 176-180, 2006.

CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

COIRO, C. J.; LANGONI, H.; SILVA, R.C.; ULLMANN, L. S. Fatores de risco para leptospirose, leishmaniose, neosporose e toxoplasmose em cães domiciliados e peridomíciliados em Botucatu-SP. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 3, p. 393-407, 2011.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina Ciências Agrárias,** Londrina, v. 22, n. 2, p. 191-201,2001.

DAHLBOM, M.; JOHNSSON, M.; MYLLYS, V.; TAPONEN, J.; ANDERSSON, M. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in finnish breeding kennels with and without reproductive problems. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 128-131, 2009.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Canine adenoviruses and herpesvirus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 38, p. 799-814, 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in dogs. **Canine Practice,** Santa Barbara, v. 28, p. 7-28, 1985.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J**ournal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; KOESTNER, A.; PIPER, R.C. Repeated transplacental transmission of Neospora caninum in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 7, p. 857-860, 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with Neospora caninum. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 329 – 336, 1996.

DUBEY, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 349-367, 1999.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Gerbils (Meriones unguiculatus) are highly susceptible to oral infection with Neospora caninum oocysts. **Parasitology Research**, v. 86, n. 2, p. 165-168, 2000.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of Neospora caninum and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P. Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology,** v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARIN, A.; BEDOYA, F.; LORA, M. C. B.; VIANNA, D.; HILL, O. C. H. Genetic and biologic characteristics of Toxoplasma gondii isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, p. 67-72, 2005.

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, n. 1/2, p. 69-75, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; 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 HGE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FAINE, S. Leptospirosis--here, now. **Pathology.** v. 13, n. 1, p. 1-5, 1981.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, 2 ed. Medsci, Melbourne, Austrália, 2000, 272p.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 37, n. 1, p. 1-23, 2009.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2007. p.437.

FORBES, L. B. Brucella abortus infection in 14 farm dogs. **Jounal American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do Norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; D´ÁURIA, S. N. R.; CARDOSO, S. M. S.; KWOK, O. C. H.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Occurrence of Neospora caninum antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology,** v. 106, n. 2, p. 177-179, 2002.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, p. 270–285, 2008.

GONDIM, L. F. P.; GAO, L.; MCALLISTER, M. M. Improved production of Neospora caninum oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GRAHAM, E. M.; TAYLOR, D. J. Bacterial Reproductive Pathogens of Cats and Dogs. The **Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice,** v. 42, n. 3, p. 561–582, 2012.

GREENE, C. E. Immunoprophylaxis and Immunotherapy. In: Greene, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998, p. 273-281.

GREENE, C. E.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006, p. 369-380.

HAGIWARA, M. K.; LUSTOSA, M.; KOGIKA, M. M. Leptospirose canina. **Vet News – Clínica Veterinária**, v.11, p.7-8, 2004.

HOLLET, R. B. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 575-587, 2006.

ISHIZUKA, M. M.; YASUDA, P. H. Incidência de infecção por *Toxoplasma gondii* em cães do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 18, n. 2, p. 161-65,1981.

JARDINE, J. E.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis in South África. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 3-4, p. 291-294, 1992.

JULIANO, R. S.; CHAVES, N. S. T.; SANTOS, C. A.; RAMOS, L. S.; SANTOS, H. Q.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S. CORRÊA FILHO, R. A. C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia, GO. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 175-184. 2007.

KAWAZOE, U. ***Toxoplasma gondii***. In: NEVES, D. P. (Ed.). Parasitologia Médica. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995, p. 174-187.

KEID, L.B. **Diagnóstico da brucelose canina por Brucella canis. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de agar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e reação em cadeia de polimerase**. 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados.** 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v.68, n.9, p.1260-1270, 2007.

KIM, O. Optimization of *in situ* hybridization assay using non-radioactive DNA probes for the detection of canine herpesvirus (CHV) in paraffin-embedded sections. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 71-73, 2004.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; AL-QASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of Neospora caninum. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; SILVA, R. C. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science,** v. 45, n. 3, p. 190–199, 2008.

LEDBETTER, E. C.; KIM, S. G.; DUBOVI, E. J.; BICALHO, R. C. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 98-105, 2009.
LEDBETTER, E. C.; KIM, S. G.; DUBOVI, E. J. Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 4, p. 242-247, 2009.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for Neospora caninum. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.

LOBATO, J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; AMARAL, J. D. H. F.; SILVA SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninun* in humans: high seropositivy rates in patients who are infected by human immunodeficiency vírus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, Ouro Preto, MG, 2004. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 13, suplemento 1, 2004.

MAGNABOSCO, C. **População domiciliada de cães e gatos no Município de São Paulo: perfil obtido através de um inquérito multicêntrico.** 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARQUEZI, D. Algo de novo no reino dos humanos. **Galileu**, v. 197, p. 41-53, 2007.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; MORAIS, Z. M.; PINTO, C. O.; SUCUPIRA, M. C .A.; DIAS, R. A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; SILVEIRA da COSTA, S.; TABATA, R.; MARCONDES, A. G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São

Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 25-32, 2002.

MASCOLLI, R. **Leishmaniose, leptospirose, brucelose, toxoplasmose, neospora e doença de Chagas na população canina da Estância Turística de Ibiúna, São Paulo: Inquérito de prevalência e fatores de risco.** 2010. 218 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hostes of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Lawrence, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MEGID, J.; MORAES, C. C. G. M.; MARCOS, J. R.; AGOTTANI, J. V. B. Perfil sorológico, isolamento bacteriano e valores hematológicos e urinários em cães naturalmente infectados com *Brucella canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 405-409, 2000.

MEGID, J.; SALGADO, V.R.; KEID, L. B.; SIQUEIRA, A. K.; CRUZ, T. F.; GRINSPAN, J.; PAES, A. C. Abortamento canino por *Brucella canis*: Relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, p.445-448, 2008.

MELLO, L. P. P.; MANHOSO, F. F. R. Aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil. **Unimar Ciências**, Marília, v. 16, n. 1-2, p. 27-32, 2007.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with Toxoplasma cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology,** Lawrence, v. 58, n. 5, p. 928-937, 1972.

MINEO, T. W. P.; CARRASCO, A. O. T.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural Neospora caninum infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology,** v. 182, n. 2-4, p. 352-355, 2011.

MIYOSHI, M.; ISHII, Y.; TAKIGUCHI, M.; TAKADA, A.; YASUDA, J.; HASHIMOTO, A.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, n. 4, p. 375-379, 1999.

MORETTI, L. D. A.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. G.; AGUIAR, D. M.; PAES, A. C.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; OGAWA, L.; KANO, F. S. Estudo comparativo entre soro e plasma na pesquisa de anticorpos anti - Toxoplasmose Gondii pela técnica de imunofluorescência indireta em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, 1996. **Sêmina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 18, n. 1, p. 15-21, 1997.

MORETTI, L. D. A.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. G.; AGUIAR, D. M.; PAES, A. C.; PEZERICO, S. B.; SILVA, A. V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Sêmina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.

NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; VIDOTO, O.; OGAWA, L.; KANO, F. S. Estudo comparativo entre soro e plasma na pesquisa de anticorpos anti - Toxoplasmose Gondii pela técnica de imunofluorescência indireta em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, 1996. **Sêmina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 18, n. 1, p. 15-21, 1997.

NÖTHLING, J. O.; HÜSSY, D.; STECKLER, D.; ACKERMANN, M. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng province of South Africa. **Theriogenology**, v. 69, n. 3, p. 276-282, 2008.

ODIN, M.; DUBEY, J. P. Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 6, p. 831-833, 1993.

OLIVEIRA, F. C. R.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus*, e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). Ciência Rural, Santa Maria, v. 31, n. 34, p. 621-626, 2001.

PACKHAM, A. E.; SVERLOW, K. W.; CONRAD, P. A.; LOOMIS, E. F.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; MARSH, A. E.; CRAY, C.; BARR, B. C. A modified agglutination test for Neospora caninum: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 5, n. 4, p. 467-473, 1998.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Serological Diagnosis of Neospora Sp. Infection**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 3, p. 352-359, 1995.

PEZERICO, S. B.; SILVA, A. V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Semina Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.

PORTO, W. J. N.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Associação entre distúrbios reprodutivos e anticorpos anti-*Brucella* sp em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió-AL. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 6-9, 2008.

PRETZER, S. D. Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. **Theriogenology.** v. 70, n. 3, p. 320-326, 2008.

READING, M. J.; FIELD, H. J. Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralization test. **Research in Veterinary Science**, v. 66, n. 3, p. 273-275, 1999.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **The Journal of Small Animal Practice,** v. 48, n. 6, p. 308-312, 2007.

RHYAN, J.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in an adult dog with hepatic necrosis and associated tissue cysts and tachyzoites. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 17, n. 1, 1992.

RIJSEWIJK, F. A.; LUITEN, E. J.; DAUS, F. J.; van der HEIJDEN, R. W.; van OIRSCHOT, J. T. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in the Netherlands in 1997-1998. **Veterinary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1-7, 1999.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

RODRIGUES, N. C.; CESARO, C.; ESMERALDINO, A. T.; ÁVILA, V. P. F.; FALLAVENA, L. C. B.; BRAGA, A. C.; CERVA, C. Alterações anatomopatológicas causadas por herpesvirus em dois filhotes Golden Retriever. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0593-2.pdf>. Acesso em 11 de Agosto de 2014.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of Neospora caninum infection. **Parasitololgy Research,** v. 84, n. 1, p. 50-53, 1998.

RONSSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLÉ, C.; BRUNET, S.; POULET, H. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenology**, v. 64, n.1, p. 61-74, 2005.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K.; CERDAS, L. Isolation of Toxoplasma from Soil. **The Journal of Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 204-206, 1973.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A. O.; BAUER, C.; CONRATHS, F. J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 14, p.1525–1537, 2005.

SCHULZE, C.; BAUMGÄRTNER, W. Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 3, p. 209-217, 1998.

SIGMAPLOT. 2008. For windows, version 11.0, Systat Software Inc., Chicago, EUA.

SILVA, R. C.; SOUZA, L. C.; LANGONI, H.; TANAKA, E. M.; LIMA, V. Y.; SILVA, A. V. Risk factors and presence of antibodies to Toxoplasma gondii in dogs from the coast of São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 161-166, 2010.

SOGORB, F.; JAMBA, L. F.; GUIMARÃES, E. C.; DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 5, p. 314-320, 1972.

STEWART, S. E.; DAVID-FERREIRA, J.; LOVELACE, E.; LANDON, J.; STOCK. N. Herpes-like virus isolated from neonatal and fetal dogs. **Science** (New York, N. Y.), v. 148, n. 3675, p. 1341-1343, 1965.

STRANDBERG, J. D.; CARMICHAEL, L. E. Eletronic microscopy of a canine herpesvirus. **Journal of Bacteriology,** v. 90, n. 6, p. 1790-1792, 1965.

STRANDBERG, J. D.; AURELIAN, L. Replication of canine herpesvirus, II. virus development and release in infected dog kidney cells. **Journal of Virology**, v. 4, n. 4, p. 480-489, 1969.

TAVARES, D. C.; FRANCO, R. P.; CRUZ, B. C.; BARROS, L. D.; SILVA, F. L.; FERREIRA, C. S.; BRESCIANI, K. D. S. Neospora caninum: Aspectos clínicos e epidemiológicos. Revisão de Literatura. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 59, p. 38-43, 2013.

TEIXEIRA, W. C.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, J. G.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; GONDIM, L. F. P. Freqüência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 685-687, 2006.

TORRES, J. G. R. Epidemiologia das zoonoses: importância em saúde pública. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária,** v. 19, n. 5, p. 185-187, 1997.

TREES, A. J.; GUY, F.; TENNANT, B. J.; BALFOUR, A. H.; DUBEY, J. P. Prevalence of antibodies to Neospora caninum in a population of urban dogs in England. **The Veterinary Record**, v.132, n. 6, p.125-126, 1993.

THRUSFIELD, M. V. 2010. **Epidemiologia Veterinária**, 3ª ed. São Paulo,p.556.

UGGLA, A.; DUBEY, J. P.; LUNDMARK, G.; OLSON, P. Encephalomyelitis and myositis in a boxer puppy due to a Neospora-like infection. **Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 2-3, p. 225-260, 1989.

VASCONCELOS, R. T. J.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; ARAÚJO NETO, J. O.; ALVES, F. A. L.; BATISTA, C. S. A.; BERNARDI, F.; SOTO, F. R. M.; OLIVEIRA, R. M.; AZEVEDO, S. S. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 436-442, 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.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P.C. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1573–1578, 2006.

YILMAZ, M. S.; HOPKINS, S. H. Effects of different conditions on duration of infectivity on Toxoplasma gondii oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 5, p. 938-939, 1972.

9. ANEXOS

Anexo A

Tabela das raças estudadas, contendo o sexo, a idade e porte dos animais.

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE (meses)	PORTE (1 = até 10,0 Kg; 0 = de 10,5 – 30,0 Kg)
CANIL 1	1	Pug	0	1	60	1
	2	Buldogue Francês	1	0	6	1
	3	Buldogue Francês	0	1	6	1
	4	Pug	0	1	24	1
	5	Buldogue Francês	0	1	5	1
	6	Buldogue Francês	0	1	18	1
	7	Buldogue Francês	0	1	5	1
	8	Buldogue Francês	1	0	30	1
	9	Pug	0	1	20	1
	10	Buldogue Francês	0	1	30	1
	11	Buldogue Francês	0	1	36	1
	12	Lulu da Pomerânia	1	0	16	1
	13	Lulu da Pomerânia	0	1	14	1
	14	Lulu da Pomerânia	0	1	60	1
	15	Shih Tzu	1	0	60	1
	16	Lhasa Apso	0	1	12	1
	17	Lhasa Apso	0	1	24	1
	18	Shih Tzu	0	1	18	1
	19	Shih Tzu	0	1	30	1
	20	Shih Tzu	0	1	36	1
	21	Shih Tzu	0	1	60	1
	22	Shih Tzu	1	0	48	1
	23	Lhasa Apso	0	1	72	1
	24	Shih Tzu	0	1	72	1
	25	Lhasa Apso	0	1	36	1
	26	Lhasa Apso	0	1	72	1
	27	Lhasa Apso	0	1	16	1
	28	Shih Tzu	0	1	36	1
	29	Shih Tzu	1	0	12	1
	30	Shih Tzu	0	1	18	1
	31	Shih Tzu	0	1	48	1
	32	Shih Tzu	0	1	12	1
	33	Buldogue Francês	0	1	4	1
	34	Shih Tzu	0	1	18	1

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
	35	Shih Tzu	0	1	60	1
	36	Lulu da Pomerânia	0	1	20	1
	37	Buldogue Francês	0	1	4	1
	38	Shih Tzu	0	1	24	1
	39	Shih Tzu	0	1	18	1
	40	Lhasa Apso	0	1	30	1
	41	Shih Tzu	0	1	36	1
	42	Shih Tzu	0	1	24	1
	43	Shih Tzu	0	1	12	1
	44	Shih Tzu	0	1	60	1
	45	Shih Tzu	0	1	36	1
	46	Shih Tzu	0	1	36	1
	47	Pug	1	0	24	1
	48	Pug	0	1	36	1
	49	Pug	0	1	48	1
	50	Shih Tzu	1	0	36	1
	51	Shih Tzu	0	1	12	1
	52	Lhasa Apso	0	1	36	1
	53	Lhasa Apso	0	1	27	1
	54	Shih Tzu	0	1	60	1
	55	Shih Tzu	0	1	36	1
	56	Poodle	0	1	30	1
	57	Shih Tzu	0	1	18	1
	58	Shih Tzu	0	1	48	1
	59	Shih Tzu	0	1	24	1
	60	Shih Tzu	1	0	30	1
	61	Bichon Frisé	0	1	48	1
	62	Shih Tzu	0	1	36	1
	63	Poodle	0	1	42	1
	64	Shih Tzu	1	0	19	1
	65	Poodle	1	0	48	1
	66	Poodle	0	1	36	1
	67	Pinscher Miniatura	1	0	7	1
	68	Poodle	1	0	72	1
	69	Shih Tzu	1	0	17	1
	70	Poodle	1	0	8	1
	71	Poodle	0	1	48	1
	72	Shih Tzu	1	0	60	1
CANIL 2	73	Shih Tzu	0	1	36	1
	74	Shih Tzu	0	1	36	1
	75	Shih Tzu	0	1	60	1
	76	Shih Tzu	1	0	36	1

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
	77	Shih Tzu	0	1	42	1
	78	Shih Tzu	0	1	24	1
	79	Shih Tzu	0	1	60	1
	80	Shih Tzu	1	0	72	1
	81	Lulu da Pomerânia	0	1	27	1
	82	Lulu da Pomerânia	0	1	17	1
	83	Lulu da Pomerânia	0	1	17	1
	84	Shih Tzu	0	1	36	1
	85	Shih Tzu	0	1	36	1
	86	Shih Tzu	0	1	48	1
	87	Lulu da Pomerânia	1	0	29	1
	88	Shih Tzu	0	1	60	1
	89	Lulu da Pomerânia	0	1	9	1
	90	Lulu da Pomerânia	0	1	12	1
CANIL 3	91	Buldogue Francês	0	1	24	1
	92	Buldogue Francês	1	0	14	1
	93	Yorkshire Terrier	0	1	42	1
	94	Pastor Alemão	0	1	22	0
	95	Golden Retriever	0	1	43	0
	96	Buldogue Francês	0	1	18	1
	97	Buldogue Francês	1	0	36	1
	98	Pug	1	0	36	1
	99	Pug	0	1	24	1
	100	Buldogue Francês	0	1	60	0
	101	Buldogue Francês	0	1	18	1
	102	Buldogue Francês	1	0	36	0
CANIL 4	103	Shih Tzu	0	1	48	1
	104	Yorkshire Terrier	0	1	18	1
	105	Shih Tzu	0	1	24	1
	106	Schnauzer miniatura	1	0	18	1
	107	Schnauzer miniatura	0	1	18	1
	108	Shih Tzu	0	1	8	1
	109	Pug	0	1	60	1
	110	Pug	0	1	13	1
	111	Shih Tzu	0	1	24	1
	112	Shih Tzu	0	1	24	1
	113	Shih Tzu	1	0	7	1
	114	Yorkshire Terrier	1	0	24	1
	115	Yorkshire Terrier	0	1	24	1
	116	Poodle	1	0	24	1
	117	Poodle	0	1	24	1
	118	Poodle	0	1	24	1

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
	119	Schnauzer miniatura	1	0	12	1
	120	Schnauzer miniatura	0	1	48	1
	121	Schnauzer miniatura	1	0	24	1
	122	Schnauzer miniatura	0	1	36	1
	123	Schnauzer miniatura	0	1	24	1
	124	Yorkshire Terrier	0	1	72	1
	125	Shih Tzu	0	1	14	1
	126	Shih Tzu	0	1	24	1
	127	Terrier Brasileiro	0	1	48	1
	128	Poodle	1	0	48	1
	129	Poodle	0	1	12	1
	130	Poodle	0	1	18	1
	131	Poodle	0	1	24	1
	132	Schnauzer miniatura	0	1	12	1
	133	Schnauzer miniatura	0	1	12	1
	134	Poodle	0	1	10	1
CANIL 5	135	Shih Tzu	0	1	10	1
	136	Shih Tzu	0	1	18	1
	137	Shih Tzu	0	1	12	1
	138	Shih Tzu	0	1	24	1
	139	Shih Tzu	1	0	24	1
	140	Shih Tzu	1	0	24	1
	141	Lulu da Pomerânia	1	0	24	1
	142	Shih Tzu	0	1	36	1
	143	Pug	1	0	4	1
	144	Yorkshire Terrier	0	1	36	1
	145	Chow Chow	0	1	36	0
	146	Shih Tzu	0	1	24	1
	147	Shih Tzu	0	1	24	1
	148	Shih Tzu	0	1	33	1
	149	Shih Tzu	0	1	13	1
	150	Shih Tzu	0	1	18	1
	151	Shih Tzu	0	1	28	1
	152	Shih Tzu	0	1	24	1
	153	Shih Tzu	0	1	26	1
	154	Shih Tzu	0	1	36	1
	155	Maltês	0	1	24	1
	156	Maltês	0	1	27	1
	157	Maltês	0	1	13	1
	158	Maltês	0	1	28	1
	159	Maltês	1	0	30	1
	160	Maltês	0	1	26	1

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
	161	Maltês	0	1	14	1
	162	Maltês	1	0	24	1
	163	Maltês	1	0	10	1
	164	Lulu da Pomerânia	1	0	12	1
	165	Yorkshire Terrier	0	1	27	1
	166	Yorkshire Terrier	0	1	33	1
	167	Yorkshire Terrier	1	0	24	1
	168	Yorkshire Terrier	0	1	38	1
	169	Yorkshire Terrier	0	1	43	1
	170	Yorkshire Terrier	0	1	48	1
	171	Shih Tzu	0	1	24	1
	172	Lulu da Pomerânia	0	1	24	1
	173	Lulu da Pomerânia	0	1	24	1
	174	Yorkshire Terrier	0	1	36	1
	175	Yorkshire Terrier	0	1	24	1
	176	Lulu da Pomerânia	0	1	43	1
	177	Maltês	0	1	24	1
	178	Lulu da Pomerânia	0	1	35	1
	179	Maltês	0	1	18	1
	180	Maltês	1	0	16	1
	181	Maltês	0	1	60	1
	182	Maltês	0	1	12	1
	183	Maltês	0	1	24	1
	184	Maltês	1	0	15	1
	185	Yorkshire Terrier	0	1	9	1
	186	Yorkshire Terrier	0	1	26	1
	187	Maltês	1	0	19	1
	188	Poodle	0	1	20	1
	189	Yorkshire Terrier	0	1	27	1
	190	Maltês	1	0	30	1
	191	Lulu da Pomerânia	1	0	23	1
	192	Lulu da Pomerânia	1	0	26	1
	193	Shih Tzu	1	0	30	1
CANIL 6	194	Schnauzer miniatura	1	0	24	1
	195	Schnauzer miniatura	0	1	24	1
	196	Schnauzer miniatura	0	1	12	1
	197	Schnauzer miniatura	0	1	36	1
	198	Poodle	0	1	72	1
	199	Poodle	1	0	24	1
	200	Poodle	0	1	27	1
	201	Poodle	0	1	31	1
	202	Shih Tzu	0	1	48	1

ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
203	Shih Tzu	1	0	60	1
204	Shih Tzu	0	1	36	1
205	Shih Tzu	0	1	24	1
206	Shih Tzu	0	1	8	1
207	Shih Tzu	0	1	27	1
208	Shih Tzu	0	1	8	1
209	Shih Tzu	0	1	24	1
210	Shih Tzu	0	1	13	1
211	Shih Tzu	1	0	7	1
212	Shih Tzu	1	0	15	1
213	Shih Tzu	0	1	26	1
214	Shih Tzu	0	1	18	1
215	Shih Tzu	0	1	18	1
216	Shih Tzu	0	1	24	1
217	Shih Tzu	1	0	32	1
218	Dogue Alemão	0	1	40	0
219	Golden Retriever	0	1	17	0
220	Golden Retriever	0	1	25	0
221	Golden Retriever	1	0	36	0
222	Golden Retriever	0	1	30	0
223	Golden Retriever	0	1	28	0
224	Chow Chow	0	1	20	0
225	Chow Chow	1	0	24	0
226	Cocker Spainel Inglês	0	1	24	0
227	Cocker Spainel Inglês	0	1	29	0
228	Cocker Spainel Inglês	0	1	36	0
229	Chow Chow	0	1	40	0
230	Chow Chow	0	1	44	0
231	Chow Chow	0	1	34	0
232	Chow Chow	1	0	36	0
233	Shih Tzu	1	0	20	1
234	Shih Tzu	0	1	48	1
235	Labrador Retriever	0	1	40	0
236	Labrador Retriever	0	1	20	0
237	Golden Retriever	0	1	24	0
238	Chow Chow	0	1	36	0
239	Golden Retriever	0	1	37	0
240	Labrador Retriever	1	0	42	0
241	Labrador Retriever	0	1	60	0
242	Labrador Retriever	0	1	50	0
243	Labrador Retriever	0	1	45	0
244	Labrador Retriever	0	1	40	0

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
	245	Labrador Retriever	0	1	20	0
	246	Labrador Retriever	0	1	32	0
	247	Pastor Alemão	0	1	48	0
	248	Pastor Alemão	1	0	18	0
CANIL 7	249	Pastor Alemão	1	0	25	0
	250	Pastor Alemão	0	1	40	0
	251	Pastor Alemão	0	1	32	0
	252	Chow Chow	0	1	42	0
	253	Dogue Alemão	0	1	36	0
	254	Labrador Retriever	0	1	24	0
	255	Golden Retriever	1	0	28	0
	256	Golden Retriever	0	1	18	0
	257	Labrador Retriever	0	1	50	0
	258	Labrador Retriever	1	0	37	0
	259	Rhodesian Ridgback	0	1	34	0
	260	Dogue Alemão	1	0	28	0
	261	Basset Hound	0	1	13	0
	262	Lhasa apso	0	1	18	1
	263	Lhasa Apso	0	1	25	1
	264	Lhasa Apso	0	1	38	1
	265	Shih Tzu	0	1	48	1
	266	Golden Retriever	1	0	36	0
	267	Labrador Retriever	0	1	42	0
	268	Pastor Alemão	0	1	20	0
	269	Buldogue Francês	0	1	24	1
	270	Dachshund	1	0	12	1
	271	Buldogue Francês	1	0	16	1
CANIL 8	272	Buldogue Francês	0	1	13	1
	273	Buldogue Francês	0	1	18	1
	274	Buldogue Francês	1	0	22	0
	275	Shih Tzu	1	0	30	1
	276	Buldogue Francês	0	1	17	1
	277	Buldogue Francês	1	0	28	1
	278	Buldogue Francês	1	0	34	1
	279	Buldogue Francês	0	1	24	1
	280	Yorkshire Terrier	0	1	13	1
	281	Yorkshire Terrier	0	1	48	1
	282	Yorkshire Terrier	0	1	26	1
	283	Yorkshire Terrier	1	0	50	1
	284	Lulu da Pomerânia	0	1	16	1
	285	Lulu da Pomerânia	0	1	22	1
	286	Lulu da Pomerânia	0	1	15	1

ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
287	Lulu da Pomerânia	0	1	27	1
288	Lulu da Pomerânia	0	1	14	1
289	Lulu da Pomerânia	0	1	22	1
290	Lulu da Pomerânia	0	1	11	1
291	Lulu da Pomerânia	0	1	11	1
292	Lulu da Pomerânia	0	1	29	1
293	Shih Tzu	0	1	16	1
294	Lulu da Pomerânia	1	0	13	1
295	Lulu da Pomerânia	0	1	18	1
296	Lulu da Pomerânia	0	1	14	1
297	Lulu da Pomerânia	0	1	13	1
298	Lulu da Pomerânia	0	1	14	1
299	Lulu da Pomerânia	0	1	23	1
300	Lulu da Pomerânia	0	1	49	1
301	Maltês	0	1	60	1
302	Lulu da Pomerânia	0	1	38	1
303	Lulu da Pomerânia	0	1	60	1
304	Maltês	0	1	54	1
305	Maltês	0	1	60	1
306	Shih Tzu	0	1	36	1
307	Yorkshire Terrier	0	1	30	1
308	Shih Tzu	0	1	11	1
309	Shih Tzu	0	1	30	1
310	Shih Tzu	0	1	36	1
311	Shih Tzu	0	1	17	1
312	Shih Tzu	0	1	15	1
313	Shih Tzu	0	1	36	1
314	Shih Tzu	0	1	14	1
315	Shih Tzu	0	1	39	1
316	Shih Tzu	0	1	12	1
317	Shih Tzu	0	1	22	1
318	Shih Tzu	0	1	16	1
319	Shih Tzu	0	1	19	1
320	Shih Tzu	1	0	14	1
321	Shih Tzu	0	1	16	1
322	Shih Tzu	0	1	31	1
323	Shih Tzu	0	1	22	1
324	Shih Tzu	1	0	43	1
325	Shih Tzu	1	0	13	1
326	Shih Tzu	0	1	39	1
327	Shih Tzu	0	1	25	1
328	Shih Tzu	0	1	36	1

ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
329	Shih Tzu	1	0	17	1
330	Shih Tzu	0	1	41	1
331	Shih Tzu	0	1	22	1
332	Shih Tzu	0	1	16	1
333	Shih Tzu	0	1	37	1
334	Shih Tzu	0	1	33	1
335	Shih Tzu	1	0	12	1
336	Shih Tzu	0	1	39	1
337	Shih Tzu	0	1	10	1
338	Shih Tzu	0	1	17	1
339	Shih Tzu	0	1	38	1
340	Shih Tzu	0	1	41	1
341	Shih Tzu	0	1	38	1
342	Shih Tzu	0	1	42	1
343	Shih Tzu	1	0	40	1
344	Shih Tzu	0	1	39	1
345	Shih Tzu	0	1	35	1
346	Shih Tzu	0	1	41	1
347	Shih Tzu	0	1	22	1
348	Shih Tzu	0	1	33	1
349	Shih Tzu	0	1	36	1
350	Shih Tzu	0	1	41	1
351	Shih Tzu	0	1	33	1
352	Lulu da Pomerânia	1	0	24	1
353	Lulu da Pomerânia	1	0	16	1
354	Lulu da Pomerânia	1	0	16	1
355	Lulu da Pomerânia	0	1	68	1
356	Lulu da Pomerânia	1	0	27	1
357	Lulu da Pomerânia	1	0	38	1
358	Lulu da Pomerânia	1	0	20	1
359	Lulu da Pomerânia	1	0	22	1
360	Lulu da Pomerânia	1	0	26	1
361	Maltês	0	1	22	1
362	Shih Tzu	1	0	36	1
363	Maltês	1	0	29	1
364	Lulu da Pomerânia	1	0	19	1
365	Shih Tzu	1	0	16	1
366	Shih Tzu	1	0	26	1
367	Lulu da Pomerânia	1	0	14	1
368	Shih Tzu	1	0	27	1
369	Maltês	1	0	25	1
370	Shih Tzu	1	0	12	1

	ANIMAL	RAÇA	MACHO	FÊMEA	IDADE	PORTE
	371	Shih Tzu	1	0	24	1
CANIL 9	372	Shih Tzu	1	0	24	1
	373	Yorkshire Terrier	1	0	15	1
	374	Shih Tzu	1	0	33	1
	375	Lulu da Pomerânia	1	0	29	1
	376	Lulu da Pomerânia	1	0	11	1
	377	Lulu da Pomerânia	1	0	18	1
	378	Maltês	0	1	45	1
	379	Maltês	0	1	22	1
	380	Maltês	0	1	58	1
	381	Lulu da Pomerânia	1	0	18	1
	382	Lulu da Pomerânia	1	0	20	1
	383	Lulu da Pomerânia	0	1	26	1
	384	Pug	1	0	30	1
	385	Pug	0	1	36	1
	386	Pug	0	1	25	1
	387	Pug	0	1	30	1
	388	Pug	1	0	24	1
	389	Pug	1	0	24	1
	390	Pug	0	1	18	1
	391	Pug	0	1	30	1
	392	Pug	0	1	26	1
	393	Pug	1	0	32	1
	394	Pug	0	1	20	1
	395	Pug	0	1	28	1
	396	Pug	1	0	18	1
	397	Pug	0	1	12	1
	398	Pug	0	1	25	1
	399	Pug	0	1	22	1
	400	Pug	0	1	30	1

Anexo B.

Questionário sobre doenças infecciosas e parasitárias

Canil_____

1) Nº total de animais: _____Machos _____
   Fêmeas_____
2) Quantos animais encontram-se em reprodução? Machos:_____
   Fêmeas: _____
3) Qual a procedência dos animais? Zona urbana ( ) ou Zona rural ( );
   Se zona rural têm livre acesso em todo local? Sim (...) ou Não (...);
   Os animais visitam o pasto? (...) Sim ou (...) Não
4) Os animais têm acesso à rua? (...) Sim ou (...) Não
5) É realizada vacinação nos animais? (...) Sim ou (...) Não
6) Quais as vacinas que são realizadas no canil?_____
7) Qual a frequência da vacinação? ( )Semestral (...)anual ( )bi-anual
8) É realizada desverminação dos animais? (...) Sim ou (...) Não;
   Se sim, qual a frequência? (...)mensal (...)trimestral (...)quadrimestral ( )semestral (...)anualmente;
9) Há variação do principio ativo/produto utilizado na desverminação dos animais? (...) Sim ou (...) Não; De quanto em quanto tempo? _____
10) Exames de fezes já foram realizados? _____
11) Que tipo de alimento os animais recebem? ( )comida caseira (...)ração (...)mista
12) Como é realizada a higienização dos comedouros? ( ) água e sabão,
    ( ) produtos de limpeza desinfetantes_____ ( ) amônia quaternária ( ) calor ( ) outros_____
    Qual a frequência? ( )diariamente, ( )semanalmente, ( )mensalmente
13) O animal come carne ? (...) Sim ou (...) Não;
    Se sim qual tipo de carne? ( ) frango (...) bovina ( ) suína;
    Como? ( ) crua ( ) mal cozida (...)cozida
14) Os animais recebem osso como “agrado”? Sim (...) ou Não (...);

Se sim, que tipo de osso? (...) couro (...) açougue

15) Como é o ambiente em geral? ( ) terra, ( ) cimento, ( ) grama, ( ) cimento + terra, ( ) cimento + grama, ( ) areia, (...) outros

16) Os animais ficam em baias individuais? (...) Sim ou (...) Não

17) O local é telado? (...) Sim ou (...) Não

18) Como é realizada a higienização do canil/quintal? ( ) água e sabão, ( ) produtos de limpeza desinfetantes_____ ( ) amônia quaternária ( )calor ( ) outro _____

19) Como é a fonte de água dos animais? ( )bebedouro de plástico (...)bebedouro de metal (...)bebedouro de barro

20) Como é realizada a higienização dos bebedouros? ( ) água e sabão, ( ) produtos de limpeza desinfetantes_____ ( ) amônia quaternária ( )calor ( ) outros_____

De quanto em quanto tempo é realizada a limpeza dos bebedouros?

( )diariamente, ( )semanalmente, ( )mensalmente

21) Os animais do canil tem acesso à outros animais? (...) Sim ou (...) Não;

22) Gatos visitam o local? (...) Sim ou (...) Não

23) Os animais que são adquiridos passam por um período de adaptação longe dos demais animais do canil? (...) Sim ou (...) Não;

Se sim, por quanto tempo? _____;

Onde ficam esses animais nesse período? _____.

24) Os animais do canil tomam banho? (...) Sim ou (...) Não;

Qual a frequência dos banhos? ( ) semanal ( ) quinzenal ( ) mensal ( )bimestral

25) Passam por tosa? (...) Sim ou (...) Não;

Que tipo? ( )total ( ) higiênica ( ) parcial/ bebê

26) Faz uso de anticoncepcional? (...) Sim ou (...) Não;

Qual? _____

27) Alguma vez já foi observado no canil presença de roedores? (...) Sim ou (...) Não;

Se sim, como foi realizada a eliminação e ou prevenção dos mesmos?

( )armadilhas/ratoeiras ( )produtos químicos/venenos. Qual? _____

28) Gatos costumas visitar o local? (...) Sim ou (...) Não;

Tem acesso a ração? (...) Sim ou (...) Não;

29) Como fica armazenada a alimentação dos animais? _____

Histórico reprodutivo

Qual o número de fêmeas?

Todas apresentam cios regulares? (...) Sim ou (...) Não

Os animais do canil saem para cruzar? (...) Sim ou (...) Não

O canil recebe animais de fora para cruzamentos? (...) Sim ou (...) Não; Onde ocorrem esses encontros? _____

Ocasionalmente ocorre nascimento de filhotes fracos? (...) Sim ou (...) Não; Morte de filhotes? (...) Sim ou (...) Não; Abortos? (...) Sim ou (...) Não; Quais os sintomas mais observados nesses neonatos? _____

Como a mãe reage diante dessas situações? _____

Quando há aborto ou morte de filhote, na próxima cruza dessa fêmea é utilizado o mesmo pai? (...) Sim ou (...) Não

Nas fêmeas que entrarão em reprodução como é realizada a vacinação? _____

E a desverminação? _____

E o controle de ectoparasitas? _____

Quais cuidados são tomados com as fêmeas após acasalamento? _____

Quais exames são realizados durante a gestação? _____

Quais cuidados são tomados com as fêmeas nos período de pré-parto? _____

E no período pós-parto? _____

Quais cuidados são tomados com os neonatos? _____