

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CO-INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis*, *Leishmania chagasi* E
Babesia canis EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM
CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL.**

Keyla Carstens Marques de Sousa

Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Dezembro de 2012

KEYLA CARSTENS MARQUES DE SOUSA

**CO-INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis*, *Leishmania chagasi* E
Babesia canis EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM
CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL.**

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof Dr Gilson Pereira Oliveira

Co- orientadores: Profa Dra Gisele Braziliano de
Andrade e Alvimar José da Costa

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Dezembro de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KEYLA CARSTENS MARQUES DE SOUSA – Filha de João José Marques de Sousa e Rosania Carstens Marques de Sousa, nascida em 18 de Janeiro de 1986 na cidade de Campo Grande, Mato Grosso Sul. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em dezembro de 2009. Foi selecionada no Programa de Pós-graduação da FCAVJ/UNESP em Medicina Veterinária, pelo Departamento de Patologia Animal sob a orientação do Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Leishmaniose visceral.....	12
2.1.1. Agente etiológico.....	12
2.1.2. Transmissão e ciclo biológico.....	12
2.1.3. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos.....	13
2.1.4. Diagnóstico.....	15
2.1.5. Tratamento.....	16
2.1.6. Epidemiologia.....	17
2.2. Erliquiose canina.....	19
2.2.1. Agente etiológico.....	19
2.2.2. Transmissão e ciclo biológico.....	19
2.2.3. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos.....	20
2.2.4. Diagnóstico.....	22
2.2.5. Tratamento.....	23
2.2.6. Epidemiologia.....	23
2.3. Babesiose canina.....	24
2.3.1. Agente etiológico.....	24
2.3.2. Transmissão e ciclo biológico.....	25
2.3.3. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos.....	26
2.3.4. Diagnóstico.....	27
2.3.5. Tratamento.....	27
2.3.6. Epidemiologia.....	28
2.4. Co-Infecções.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Locais de coleta.....	32
4.2. Diagnósticos sorológicos.....	32
4.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	32

4.2.1.1. RIFI para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i>	32
4.2.1.2. Cultivo do antígeno	32
4.2.1.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania chagasi</i>	33
4.2.1.4. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de <i>Ehrlichia canis</i>	33
4.2.1.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i>	34
4.2.1.6. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de <i>Babesia canis</i>	34
4.2.1.7. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia canis</i>	36
4.2.2. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste)	36
4.2.2.1. Preparação do antígeno total solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	36
4.2.2.2. Descrição da reação	37
4.3. Testes moleculares	37
4.3.1. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	38
4.3.1.1. Extração de DNA de tecido esplênico	38
4.3.1.2.1. Seleção dos primers para <i>Leishmania</i> spp e <i>L. chagasi</i>	38
4.3.1.2.2. Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> sp	38
4.3.1.2.3. Amplificação de DNA de <i>Leishmania chagasi</i>	39
4.3.1.3. Amplificação do DNA da espécie <i>Babesia canis</i>	39
4.3.1.4.1 Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> spp. baseada no gene dissulfito oxidoreductase (dsb)	39
4.3.1.4.2. Amplificação do DNA da espécie <i>Ehrlichia canis</i>	40
4.3.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose	40
4.4. Seqüenciamento	41
4.4.1. Extração dos Amplímeros do Gel de Agarose	41
4.4.2. Quantificação de DNA dos amplímeros	41
4.4.3. Seqüenciamento	41
4.4.4. Análise das Seqüências	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	43
5.1.1. Soropositividade para <i>Leishmania chagasi</i>	43
5.1.2. Soropositividade para <i>Ehrlichia canis</i>	43
5.1.3. Soropositividade para <i>Babesia canis</i>	43
5.1.4. Co-soropositividade para <i>L. chagasi</i> , <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i>	44
5.2. Teste de ELISA Indireto para <i>Leishmania chagasi</i>	46
5.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	48
5.3.1. PCR para <i>Leishmania chagasi</i> , <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i>	48

5.3.2. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para <i>Leishmania</i> spp.	51
5.3.3. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para o complexo <i>L.Donovani</i>	52
5.3.4. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para <i>E.canis</i>	52
5.3.5. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para <i>Babesia</i> sp.....	53
5.3.6. Co-positividade e co-negatividade dos cães frente as PCRs para <i>Leishmania</i> spp e <i>E.canis</i>	53
5.3.7. Co-positividade e co-negatividade dos cães frente às PCRs para o complexo <i>L.Donovani</i> e <i>E.canis</i>	54
5.3.8. Co-positividade e co-negatividade dos cães nas PCRs para o complexo <i>L.Donovani</i> e <i>Babesia</i> sp.	54
5.3.9. Co-positividade e co-negatividade dos cães nas PCRs de <i>E.canis</i> e <i>Babesia</i> sp.	55
5.4. Análise das similaridades de seqüências obtidas pelo BLAST	55
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti- <i>L. chagasi</i> em cães naturalmente infectados coletados no CCZ/CG/MS.....	43
Tabela 2. Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i> em cães naturalmente infectados coletados no CCZ/CG.....	44
Tabela 3. Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti- <i>B. canis</i> em cães naturalmente infectados coletados no CCZ/CG/MS.....	44
Tabela 4. Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de <i>L. chagasi</i> e <i>E. canis</i> coletados no CCZ/CG/MS.....	45
Tabela 5 Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de <i>L. chagasi</i> e <i>B. canis</i> coletados no CCZ/CG/MS.....	45
Tabela 6: Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i> coletados no CCZ/CG/MS.....	45
Tabela 7: Distribuição dos soros de animais naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> coletados no CCZ/CG/MS em níveis de ELISA.....	46
Tabela 8. Resultados de absorbância, níveis de ELISA e titulações da RIFI.....	47
Tabela 9. Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para <i>Leishmania</i> spp para os cães amostrados.....	51
Tabela 10: Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para <i>L. Donovanii</i> para os cães amostrados.....	52
Tabela 11. Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para <i>E. canis</i>	52
Tabela 12 Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para <i>Babesia</i> sp.....	53
Tabela 13. Co-positividade e co-negatividade na PCR para <i>Leishmania</i> sp e <i>E. canis</i>	53
Tabela 14. Co-positividade e co-negatividade nas PCRs do c. <i>L. Donovanii</i> e <i>E. canis</i>	54
Tabela 15. Co-positividade e co-negatividade nas PCRs do complexo <i>L. Donovanii</i> e <i>Babesia</i> sp.....	54
Tabela 16. Co-positividade e co-negatividade nas PCRs de <i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> sp.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição dos soros, em níveis de ELISA (0-9), submetidos ao teste ELISA para a detecção de anticorpos anti-*L.chagasi*.....48
- Figura 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Leishmania* sp obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores L1 e L2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.....49
- Figura 3. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para o complexo *L.Donovani* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores MC1 e MC2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.....49
- Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Ehrlichia* sp obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores dsb-330 e dsb-728. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.....50
- Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *Ehrlichia canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN5 e HE3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.....50
- Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Babesia* sp obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores Piro A e Piro B. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.....51

CO-INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis*, *Leishmania chagasi* E *Babesia canis* EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL.

RESUMO - Dentre as doenças emergentes causadas por artrópodes em cães destacam-se as infecções por agentes das espécies *Leishmania chagasi*, transmitida por flebotomíneos, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* transmitidas por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. O presente estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico sorológico e molecular de parasitos das espécies *Leishmania chagasi*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em amostras de soro e de baço, respectivamente. Foram utilizados 60 cães naturalmente infectados, eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses do Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 60 (100%), 39 (65%) e 49 (81%) dos 60 animais amostrados foram sororeagentes frente aos antígenos de *L.chagasi*, *E.canis* e *B.canis* respectivamente. Também foi realizado o ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA-teste) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*L. chagasi*, onde sessenta cães (100%) mostraram-se soropositividade. Cinquenta e quatro cães (90%) mostraram-se positivos na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para o gênero *Leishmania* sp e destes cinquenta e três animais, 53 (88%) foram positivos para o complexo *L.Donovani*. Vinte e sete animais (45%) foram positivos para *Ehrlichia* e destes animais todos foram positivos para *E.canis* pelo nested PCR e 2 (3,33%) cães foram PCR positivos para *Babesia* sp. Os amplicons foram confirmados por seqüenciamento e os DNAs mostraram 99% de similaridade genética para *L.chagasi*, *E.canis* e *B.canis*. Este estudo mostrou que os cães residentes em Campo Grande/MS, podem albergar mais de um hemoparasita, As co-infecções por agentes patogênicos intracelulares de células do sistema monocítico fagocitário, como é o caso da *Ehrlichia* e *Leishmania*, associadas ou não a *Babesia* (que se multiplica em hemácias), causam graves prejuízos à saúde dos animais. A queda na condição física e imunológica decorrente das co-infecções eleva a parasitemia, que em se tratando de agentes transmitidos por artrópodes é condicionante para o sucesso da transmissão.

Palavras-chave: Leshmaniose, erliquiose, babesiose, co-infecção, PCR, sorologia

**COINFECTION *Ehrlichia canis*, *Leishmania chagasi* AND *Babesia canis*
IN NATURALLY INFECTED DOGS IN CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO
SUL.**

SUMMARY - Among emerging diseases caused by arthropods in dogs stand out infections by agents of the species *Leishmania chagasi*, transmitted by sandflies, *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* transmitted by ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus*. The present study aims to perform serological and molecular diagnosis of parasites of the species *Leishmania chagasi*, *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* in samples of sera and spleen, respectively. A total of 60 naturally infected dogs were euthanized at the Zoonosis Control Center of the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul Through Immunofluorescence Assay (IFA), sixty (100%), 39 (65%) and 49 (81%) of the 60 animals sampled were reactive serum against the antigens *L.chagasi*, *E.canis* and *B. canis*, respectively. We also performed indirect immunosorbent assay (ELISA test) for detection of IgG antibodies anti-*L. chagasi*, where sixty dogs (100%) were seropositive. Fifty-four dogs (90%) were positive by PCR for the genus *Leishmania*, and of these fifty and three animals, 53 (88%) were positive for the complex *L.Donovani*. Twenty-seven dogs (45%) were positive for *Ehrlichia sp* and these animals were all positive for *E.canis* by nested PCR and two dogs (3%) were PCR positive for *Babesia sp*. The amplicons were confirmed by DNA sequencing and showed 99% genetic similarity to *L.chagasi*, *E.canis* and *B. canis*. This study showed that dogs living in Campo Grande / MS, can accommodate more than one haemoparasite. The co-infections by intracellular pathogens monocytic phagocyte system cells, as is the case with Ehrlichia and Leishmania, associated or not with Babesia (which multiplies in red blood cells), causing serious damage to the health of animals. The decline in physical condition and immune co-infections resulting from increases parasitemia, which in the case of agents transmitted by arthropods is a condition for the success of the transmission.

Keywords: leishmaniasis, ehrlichiosis, babesiosis, coinfection, PCR, serology

1.INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por artrópodes são mundialmente ressaltadas como de importância à saúde humana e animal. Numerosos agentes infecciosos em diferentes hospedeiros induzem enfermidades diversas. Em várias situações a presença de infecções concomitantes, ou co-infecções, confunde o diagnóstico clínico e dificulta o tratamento (HARRUS e BANETH, 2006). Visto que o cão doméstico é o principal animal de estimação convivendo em estreito contato com seres humanos, muitas espécies de artrópodes vetores possuem hábitos alimentares envolvendo tanto humanos como animais, os cães devem receber atenção especial, pois podem estar atuando como reservatórios de patógenos em meios domiciliares.

Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, a enzootia de agentes transmitidos por artrópodes vetores é assegurada devido as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de espécies de artrópodes vetores, juntamente com a presença de animais silvestres em convívio direto com animais domésticos e o homem (SALGADO, 2006). Dentre as doenças emergentes transmitidas por artrópodes em cães, destacam-se as infecções por agentes dos gêneros *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, *Ehrlichia* e *Babesia* transmitidos por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Neste Estado, a leishmaniose visceral canina (LVC) é preocupante à população humana, constituindo-se hoje, no principal destaque parasitário/humana, segundo a Secretaria Estadual de Saúde/MS - Serviço de Operações e Epidemiologia. Em estudo preliminar, SALGADO (2006), realizou esfregaços de sangue periférico e venoso de 167 cães, procedentes de várias regiões do município de Campo Grande, MS, obtendo resultados positivos para *Ehrlichia* sp, *Babesia* sp, *Hepatozoon* sp e *Borrelia* sp. Os quadros clínicos apresentados por essas doenças, muitas vezes passam despercebidos, resultando em casos de insucesso de terapêutica adotada (AGUIAR, 2006). Tal fato se deve aos sinais clínicos semelhantes nas infecções causadas por estes agentes. A presente pesquisa teve como objetivo diagnosticar a presença de *L.chagasi*, *E.canis* e *B.canis* nos cães recebidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande, MS, por meio de técnicas sorológicas e moleculares, verificando a ocorrência de co-infecções.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmaniose visceral

2.1.1. Agente etiológico

A leishmaniose é causada por um protozoário da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*. Dentre as 15 espécies que infectam o homem, 13 têm natureza zoonótica, causando as formas visceral, cutânea ou mucocutânea (GRAMICCIA & GRADONI 2005). A espécie envolvida na infecção na leishmaniose visceral depende da região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *L. infantum* na Ásia, Europa e África. Desde a sua descrição por CUNHA E CHAGAS (1937) *L. chagasi* tem sido incriminada como agente causador da LV nas Américas, entretanto, hoje a comunidade científica reconhece que a LV americana é causada por *L. infantum* e que a presença deste ocorreu devido a múltiplas introduções recentes através de cepas vindas do sudoeste europeu (CUNHA E CHAGAS, 1937; DANTAS-TORRES, 2006 e KATRIN KUHLIS et al., 2011).

As leishmanias são protozoários pleomórficos que completam seus ciclos de vida em dois hospedeiros, sendo um vertebrado e um invertebrado (KONTOS; KOUTINAS, 1993). São parasitos digenéticos, apresentando duas formas durante o ciclo biológico: aflagelada ou amastigota, intracelular obrigatória, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, e a outra, flagelada ou promastigota, encontrada no trato digestório anterior dos insetos vetores (SLAPPENDEL, 1988; SÃO PAULO, 2003).

A LVC é uma doença de potencial zoonótico com grande impacto na saúde pública, e com distribuição mundial (ALVES et al., 2010; MOREIRA et al., 2008). Estima-se que a população mundial exposta ao risco de adquirir a doença seja de 350 milhões de indivíduos, com aproximadamente 12 a 14 milhões de pessoas infectadas (DESJEUX, 2004).

2.1.2. Transmissão e ciclo biológico

A transmissão entre hospedeiros vertebrados no Brasil ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (CASTRO, 1996; CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997;

POCAI et al., 1998; RIBEIRO, 2001), conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuquiras (FEITOSA et al., 2000). Trabalhos recentes sugerem o possível envolvimento de outras espécies do gênero *Lutzomyia* na transmissão em áreas não endêmicas das Américas do Norte e do Sul (TRAVI, 2002), como por exemplo em Corumbá/MS, foi encontrada uma outra espécie, *Lutzomyia cruzi*, parasitada por *L. chagasi* (SANTOS et al., 1998).

Os vetores da *L. chagasi* não fazem ciclo larval na água e sim na matéria orgânica úmida. Os cães e os humanos são mais atingidos pelas picadas durante a noite, principalmente no período das 18 às 22 horas. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No seu lúmen intestinal as células se rompem e liberam as formas amastigotas que se multiplicam e geram promastigotas (forma alongada medindo cerca de 20 micrômetros). Estes se multiplicam por divisão binária, colonizando a parte anterior do trato digestivo, mais especificamente o esôfago e faringe dos flebotomíneos, sendo essas formas infectantes inoculadas através da saliva das fêmeas durante o repasto sanguíneo. No corpo do hospedeiro vertebrado as formas promastigotas são fagocitadas pelas células histocitárias da pele e, uma vez no interior delas, transformam-se em amastigotas (forma ovalada ou arredondada, medindo de 2 a 5 micrômetros de diâmetro sem a presença de flagelo livre) capazes de desenvolver-se e multiplicar-se por divisão binária simples. Após sucessivas multiplicações, as células do SFM se rompem, e as formas amastigotas liberadas são fagocitadas por outros macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então à disseminação hematogênica para outros tecidos, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. (SILVA, 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009; AZEVEDO, 2007).

2.1.3. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos

A LVC é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (BRASIL, 2003). Quando o parasito acomete espécies susceptíveis, a imunossupressão por ele causada permite a sua disseminação para muitos órgãos (CARVALHO et al., 2007). Desta forma, é possível classificar os cães como assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Cães aparentemente assintomáticos podem atuar como fonte de infecção aos vetores, potencialmente participando do ciclo zoonótico de transmissão (SANTOS et al., 2010).

A infecção usualmente causa doença sistêmica crônica. Classicamente, a leishmaniose em cães apresenta sinais inespecíficos como febre, apatia, anorexia, perda de peso, linfadenomegalia localizada ou generalizada; lesões dermatológicas, diarreia, falência renal, ceratoconjuntivite, epistaxe, anemia e onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2007; IKEDA-GARCIA E MARCONDES, 2007; MACHADO et al., 2007). Ocasionalmente podem ser observadas alterações locomotoras, hepáticas, respiratórias, cardíacas e/ou neurológicas (NOGUEIRA et al., 2009).

O estudo da resposta imunológica hospedeiro-parasito como fator de desencadeamento e severidade das lesões clínicas é essencial para melhor compreensão e caracterização da doença (MACHADO et al., 2007). As alterações patológicas na LVC são causadas pela presença do parasito nos tecidos, que causa lesões inflamatórias não supurativas, e pela deposição de imunocomplexos em vários órgãos e tecidos, principalmente no baço, fígado e rins. Dentre as principais lesões histopatológicas observadas em cães incluem-se a hipertrofia e hiperplasia das células do sistema fagocítico mononuclear (principalmente do baço, linfonodo, fígado e medula óssea), inflamação crônica na pele, reação inflamatória granulomatosa no fígado e no baço, pneumonia intersticial e glomerulonefrite.

A ocorrência de alterações hematológicas em cães com LVC é muito importante e freqüente. Na série vermelha, observa-se anemia geralmente normocítica e normocrômica arregenerativa em 57 a 94,2% dos animais (KONTOS & KOUTINAS, 1993; KOUTINAS et al., 1999; CIARAMELLA & CORONA, 2003; IKEDA et al., 2003). A patogênese da anemia na leishmaniose visceral não é totalmente conhecida e acredita-se que mais de um fator esteja envolvido, como o seqüestro esplênico das hemácias e diminuição da produção medular perda sangüínea, hemólise e mecanismos imunomediados (KONTOS & KOUTINAS, 1993; LISTE BURILLO et al., 1994; SLAPPENDEL & FERRER, 1990; KOUTINAS et al., 1999; DE LUNA et al., 2000; CIARAMELLA & CORONA, 2003; IKEDA et al., 2003).

Os animais assintomáticos representam grande problema para a saúde pública, pois a detecção da infecção é difícil, o que impossibilita a adoção de medidas adequadas de controle (MACHADO et al. 2007). A intensidade do parasitismo aparentemente não está associada diretamente à gravidade do quadro

clínico, podendo ser observados cães com sintomatologia leve à infecção intensa (FEITOSA et al., 2000; CAMARGO-NEVES et al., 2006).

2.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico clínico da (LVC) é difícil devido à variedade de manifestações clínicas da doença. Os achados clínicos são comuns a outras enfermidades, tornando o diagnóstico laboratorial ou parasitológico necessários para a confirmação da suspeita. Outro ponto importante é que a maioria dos cães infectados não desenvolve sinais clínicos, o que dificulta o diagnóstico (IKEDA-GARCIA E MARCONDES, 2007). Para a detecção da leishmaniose visceral existem basicamente três categorias de provas utilizadas: métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (NOGUEIRA et al., 2009).

O método parasitológico é realizado através da análise citológica de lâminas de esfregaços ou “imprints”, permitindo a identificação direta de formas amastigotas no tecido animal (BRASIL, 2006). A pesquisa direta do parasito apresenta especificidade de 100%, no entanto a sensibilidade é baixa, em torno de 60 a 80% (LUVIZOTTO, 2006), sendo ainda menor em cães assintomáticos, podendo ocorrer resultados falsos negativos (FARIA, 2007). A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (BRASIL, 2006).

Vários autores, MARZOCHI et al., (1985); SANTA ROSA e OLIVEIRA, (1997), utilizam técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e dentre essas, descreve-se principalmente a reação de fixação de complemento (FC), imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático Indireto (ELISA-indireto). Em pesquisas realizadas por OLIVEIRA et al. (2008), anticorpos anti-*Leishmania* não foram detectados em soros de cães do município de Jaboticabal, pela RIFI e ELISA-teste, embora, neste último, pequena porcentagem de animais apresentasse reação inespecífica. Logo, fica demonstrada a importância elevada de aspectos sorológicos, clínicos e epidemiológicos no contexto do diagnóstico da LVC.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta-se como opção que vem somar ao diagnóstico da LVC, permitindo a identificação de fragmentos do genoma do protozoário a partir de quantidade mínima de DNA (MARTINS, 1999). Este

exame pode servir como o melhor ferramenta para diagnosticar a infecção por *Leishmania* quando comparado aos exames parasitológicos tradicionais (ASHFORD et al., 1995). Primers (Oligonucleotídeos iniciadores) desenhados para amplificar múltiplas cópias da seqüência alvo, como minicírculos de Kinetoplastida, tem demonstrado sensibilidade e rápido diagnóstico baseado no DNA da infecção por *Leishmania* (SMYTH et al., 1992; REALE et al., 1999; SINGH et al., 2003).

Entretanto, a sensibilidade e a especificidade do PCR dependem da escolha de primers, protocolo de extração de DNA e fonte de material para biópsia (LACHAUD et al., 2001; REITHINGER et al., 2000). A utilização de amostra de sangue é uma metodologia menos invasiva do que amostras de medula óssea, baço, ou aspirado de linfonodo. Por outro lado, o número de parasitos no sangue tende a ser menor do que naqueles órgãos, além da presença de inibidores de PCR (heme), que interferem na sensibilidade da técnica (REITHINGER et al., 2002).

A LVC, apesar dos inúmeros testes diagnósticos disponíveis, continua a representar um desafio, pois não existe método capaz de obter sensibilidade e especificidade máxima, a sensibilidade das técnicas varia durante a evolução da doença bem como entre os indivíduos, sendo que no início, antes da soroconversão ou desenvolvimento de sintomas, o exame parasitológico e a PCR são mais sensíveis. (QUINNELL et al., 2001 ; LUVIZOTTO, 2006; SILVA et al., 2006).

A fim de avaliar o papel do cão no ciclo de transmissão da LVC, as manifestações clínicas da doença devem ser conhecidas, incluindo a caracterização patológica da extensão das lesões em vários órgãos comprometidos (ALVES et al., 2010). O diagnóstico preciso e a identificação dos animais assintomáticos é essencial à vigilância epidemiológica e ao controle da disseminação do agente (CARVALHO et al., 2007).

2.1.5. Tratamento

O tratamento de cães não é uma ferramenta interessante no controle da leishmaniose visceral, pois, animais tratados podem ter sua carga parasitária aumentada apesar de aparentar cura clínica (WHO, 2008). A droga de primeira escolha no Brasil e no mundo para o tratamento humano é o antimonial pentavalente, na forma de antimoniato de N-metilglucamina. A anfotericina B, antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida, é determinada como de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com

antimonial ou na impossibilidade de seu uso. Considerada mais eficaz que os antimonials no tratamento das lesões mucosas. A anfotericina B lipossomal, nova formulação, que se incorpora dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol, atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B (MANUAL ZOONOSES, 2009).

2.1.6. Epidemiologia

A LVC ocorre em 65 países, sendo que 90% dos casos são provenientes das regiões rurais pobres ou suburbanas de cinco países (Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil). Em toda a América já foram registrados mais de 5.000 casos de LV (PAHO, 2007). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, distribuídos desde o México até o norte da Argentina, sendo 90% dos casos de ocorrência no Brasil (GUERIN et al., 2002; BRASIL, 2003; DESJEUX, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005)

Atualmente, a (LVC) ocorre de forma endêmica em 20 dos 27 Estados do Brasil, além do Distrito Federal, sendo que em todos eles tem sido relatada a associação entre a existência de cães infectados e a presença do vetor (MILES et al., 1999; LAINSON; RANGEL, 2005).

Nas últimas duas décadas, a LV tem ocorrido com grande frequência em áreas urbanas de cidades, como: São Luis - MA, Natal - RN, Aracaju - SE, Cuiabá - MT, Campo Grande - MS, Belo Horizonte - MG e Rio de Janeiro - RJ (DESJEUX, 2004; GONTIJO e MELO, 2004). A doença, que era tipicamente rural, a partir de 1980 passou a ser responsável por epidemias urbanas, inicialmente em Teresina – PI e em São Luís – MA.

O padrão de transmissão da doença pode se modificar devido às alterações ambientais e, conseqüentemente, à adaptação do vetor, associados às migrações da população humana. O Estado de Mato Grosso do Sul sofreu, nos últimos anos, modificações ambientais que podem ter contribuído para a disseminação do vetor, como construção de um gasoduto e a destruição de áreas do cerrado. No município de Campo Grande, a abertura de avenidas acompanhando os cursos das águas e a derrubada da vegetação para construção de casas populares foram fatores de mudança do ambiente (SILVA et al., 2007).

Os reservatórios vertebrados mais importantes no Brasil são os canídeos domésticos e selvagens, que mantêm o ciclo do agente. Estes, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo, facilitam à infecção pelo inseto e, por isso, são os mais importantes na manutenção da cadeia de transmissão e ciclo ecológico do parasito (SÃO PAULO, 2003).

No período de 2002 a 2006 foram registrados 568 casos confirmados de LV humana residentes em Campo Grande MS, a estimativa de incidência de LV para toda a população variou de 3,1 casos/100.000 habitantes no primeiro ano (2002) até o máximo de 21,3 casos/ 100.000 habitantes em 2006. Crianças menores de cinco anos tiveram o maior risco, com incidência que variou de 11,3 até 64,3 casos/100.000 habitantes. A segunda população com maior risco foram aqueles com idade de 60 e mais anos: a incidência variou de 2,0 casos /100.000 habitantes no ano 2002 até 34,2 casos/100.000 habitantes, no ano 2006. (EPIDEMIOL. SERV. SAÚDE, 2010).

O primeiro relato de *L.chagasi* em cães na área urbana de Campo Grande aconteceu no ano de 2000, com 29 cães positivos no total de 1303 examinados (SILVA et al., 2000), os números aumentaram a cada ano chegando a 104 em 2003, fazendo do município área endêmica. (SESAU / MS, 2005). O último inquérito sorológico publicado pelo CCZ, examinou 116.642 amostras caninas durante os anos de 2002 até 2006 e foi observado positividade em 26.793 (23,7%) amostras (EPIDEMIOL. SERV. SAÚDE, 2010). ANDREOTTI et al. (2006) coletaram 345 amostras de cães vindos do CCZ e verificaram soropositividade em 29% das amostras, já em estudo recente com 200 cães também do CCZ, CUNHA et al. (2012) constataram a presença de anticorpos anti-*L.chagasi* em 80% das amostras. Estes dados mostram que está ocorrendo aumento progressivo de animais sororeagentes no município, tal fato pode ser atribuído ao aumento da densidade vetorial, causada por mudanças ambientais como a abertura de avenidas acompanhando os cursos dos córregos e a derrubada da vegetação para construção de casas populares (OLIVEIRA et al. 2006).

2.2. Erliquiose canina

2.2.1. Agente etiológico

Atualmente o gênero *Ehrlichia* contempla cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001), havendo uma possível sexta espécie, identificada, por SHIBATA et al. (2000) no Japão, isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, classificada como *Ehrlichia oie*. São denominadas bactérias gram-negativas, parasitos intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos, e para algumas espécies, neutrófilos e células endoteliais (DUMLER et al., 2001).

2.2.2. Transmissão e ciclo biológico

A *Ehrlichia canis* (erliquiose canina) é o agente mais comum e patogênico que, ao infectar leucócitos mononucleares, forma as inclusões citoplasmáticas denominadas mórulas. Estas inclusões de aspecto compacto são formadas por agrupados de pequenas estruturas que variam de forma cocóide a elipsoidal (RISTIC e HUXSOLL, 1984). Segundo NYINDO et al. (1971), o desenvolvimento das mórulas inicia-se num único corpúsculo elementar dentro do monócito, que se multiplica formando inclusões citoplasmáticas imaturas, denominados corpúsculos iniciais, os quais se desenvolvem após 7 a 12 dias de incubação. Neste estágio, muitos monócitos estão três a quatro vezes maiores que o seu tamanho original (NYINDO et al., 1971). O ciclo de desenvolvimento de *Ehrlichia* spp na célula hospedeira, inicia-se com a adesão de pequenas células densamente coradas (CD), as quais acabam por penetrar em seu interior. Dentro de um vacúolo na célula hospedeira, as células-densas rapidamente se transformam em células reticuladas (CR), as quais se multiplicam por divisão binária em aproximadamente 48 horas e, após 72 horas de infecção, maturam e se transformam em células-densas novamente. Estas, por sua vez, são liberadas da célula hospedeira e recomeçam um novo ciclo de infecção (ZHANG et al., 2006).

O carrapato se infecta ao ingerir leucócitos circulantes contendo o agente. Isto geralmente ocorre na segunda ou terceira semana de infecção do cão (fase aguda), quando há maior número de leucócitos infectados. Nos casos de cães na fase

crônica é pouco provável a transmissão do agente para o seu vetor biológico (LEWIS Jr. et al., 1977). A multiplicação acontece nas células epiteliais do intestino, hemócitos, e nas células das glândulas salivares. Ocorre transmissão transestadial, mas não transovariana, fazendo do cão o principal reservatório do agente. Dessa forma, a transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre pelos estádios de ninfa e adulto (GROVES et al., 1975).. O parasito se localiza nas células reticulo endoteliais do fígado, baço e nódulos linfáticos, onde ocorre a replicação primária em macrófagos mononucleares e linfócitos (SWANGO et al., 1989).

Seu principal vetor é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (LEWIS et al., 1977), e embora, em condições experimentais, o carrapato *Dermacentor variabilis* também seja capaz de transmitir a *E. canis* (WANER et al., 1999). No Brasil, COSTA Jr et al. (2007) incluíram também o *Amblyomma cajennense* como potencial vetor de *E. canis* em áreas rurais.

2.2.3. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos

A patogenia da erliquiose canina envolve um período de incubação de 8 a 20 dias. A doença é caracterizada por ser sistêmica, que varia de intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Em infecções experimentais, é possível diferenciar as três fases, mas em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares, e a duração e severidade desses sinais são variáveis (HARRUS et al., 1997; SANTARÉM, 2003).

Os principais sinais clínicos observados em cães com erliquiose canina são febre, anorexia, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, distúrbios cardiorrespiratórios, alterações oculares (WALKER et al., 1970; TROY e FORRESTER, 1990; CASTRO, 1997), musculoesqueléticas, neurológicas e renais (MEINKOTH et al., 1989; BUORO et al., 1990; CODNER e MASLIN 1992; GOULD et al., 2000).

Os achados laboratoriais mais freqüentemente observados variam de acordo com a fase clínica, porém, muitas vezes repetem-se com maior ou menor intensidade. (CASTRO, 1997).

A trombocitopenia ocorre 10 a 20 dias pós-infecção (PI) e tende a persistir ao longo de todas as fases da doença (BUHLES Jr., et al., 1974; DAVOUST et

al.,1991). A leucopenia moderada ocorre ao redor da 3ª e 4ª semanas PI, tendendo a desaparecer seguida de leucocitose e monocitose (HIBBLER et al.,1986). Foi relatado que cerca da metade dos animais acometidos por erliquiose canina apresentam eosinopenia. A linfopenia aparece em mais de 60% dos cães. A linfocitose é mais infreqüente durante a fase aguda, enquanto que anemia do tipo regenerativa é um achado muito comum (TROY e FORRESTER, 1990). Em vinte e sete casos de infecção natural por *Ehrlichia canis*, a trombocitopenia e a anemia estavam presentes em quase todos, enquanto a leucopenia não se evidenciava (WADDLE ; LITTMAN, 1988). Os animais doentes apresentaram-se com discretas variações nos valores do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), caracterizando anemia do tipo normocítica-normocrômica (KUEHN e GAUNT, 1985).

Durante a fase crônica, as alterações hematológicas são semelhantes às descritas para a fase aguda. A anemia e trombocitopenia são geralmente mais proeminentes e responsáveis pela maior parte dos sinais clínicos (WADDLE e LITTMAN, 1988). A pancitopenia, geralmente ocorre nos casos crônicos e graves devido à hipoplasia das células progenitoras na medula óssea (HIBBLER et al., 1986).

As proteínas séricas normalmente sofrem variações no decurso da doença. Pode-se observar, na maior parte das vezes, hiperproteinemia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Esta última, mais marcante durante a fase aguda, tendendo a reverter-se na fase subclínica (TROY; FORRESTER, 1990).

Os níveis das enzimas alaninoaminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina podem estar aumentados, especialmente durante a fase aguda. Em pequena porcentagem dos cães pode-se encontrar elevações dos níveis de bilirrubina e discreta icterícia. Aumentos nos valores de uréia e creatinina parecem refletir um quadro de azotemia pré-renal (TROY e FORRESTER, 1990). Porém TROY et al (1980) já haviam observado casos em que os animais morriam de insuficiência renal devido a glomerulonefrite.

Mecanismos inflamatórios estão envolvidos na patogenia da doença. Estes incluem intensa infiltração leucocitária em órgãos parenquimatosos, manguitos perivasculares (particularmente nos pulmões, rins, baço, meninges e olhos), hemaglutinação e hipergamaglobulinemia. A demonstração de anticorpos

antiplaquetários em cães experimentalmente infectados por *E. canis* reforça a teoria de que a doença possuiu um componente imunopatológico (HARRUS et al., 1997).

Os principais achados macroscópicos observados em cães que foram à óbito por erliquiose são representados por lesões em vários órgãos e tecidos do sistema linfohemopoético, sistema nervoso, sistema urinário, sistema cárdio-respiratório, trato gastrintérico e outros (HILDEBRANDT et al., 1973; TROY; FORRESTER, 1990). Dentre os achados de necropsia, a linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia e hemorragia difusa ou petequiral na superfície mucosa, ou serosa e parênquima de diversos órgãos, estão entre os mais importantes e freqüentes (EWING, 1969; REARDON e PIERCE, 1981a; VALLI, 1993; CASTRO, 1997).

2.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose é baseado na combinação dos sinais clínicos, anormalidades hematológicas, achados citológicos e sorológicos, sendo mais recentemente a reação em cadeia da polimerase incorporada ao plano diagnóstico (NEER e HARRUS, 2006). O diagnóstico laboratorial da erliquiose pode ser realizado, rotineiramente, pela identificação direta de corpúsculos de inclusão ou mórulas de *E. canis* em leucócitos de sangue periférico (ELIAS, 1991). Importante ressaltar, que, na maioria dos casos de infecção natural, a detecção direta do parasito não é possível, devido ao pequeno número de células infectadas (HARRUS et al., 1997).

As bactérias do gênero *Ehrlichia* induzem resposta humoral específica, base para o diagnóstico sorológico (RIKIHISA, 1991), ocorrendo soroconversão nos animais logo após a infecção (OTRANTO et al., 2009). Dentre os testes sorológicos, a imunofluorescência indireta é utilizada no diagnóstico, sendo aplicável tanto para estudos de infecções experimentais quanto epidemiológicos. Os antígenos utilizados são procedentes do cultivo de células infectadas com *E. canis*, havendo detecção de anticorpos precoces em até sete dias pós-infecção, embora a maioria dos cães se torne soropositivos decorridos 28 dias (HARRUS et al., 1997).

A nPCR é um ensaio altamente específico e sensível, sendo uma técnica capaz de determinar se um cão soropositivo é portador ou não de *E. canis*, (IQBAL e RIKIHISA, 1994b; WEN et al., 1997) podendo também ser empregada para avaliação da eficácia na terapia contra a doença (HARRUS et al., 1998b).

Aspirados de baço, fígado, rins, mesentério, linfonodos poplíteos, sangue e de medula óssea de cães infectados, podem ser utilizados para extração de DNA do parasito. Contudo, para alguns pesquisadores o DNA extraído de baço é o melhor tipo de amostra para PCR, no diagnostico do estado de portador de *E. canis*, durante a fase subclínica (IQBAL & RIKIHISA, 1994a; HARRUS et al., 1998a). FARIA (2006), comparando a detecção de DNA erliquial em sangue e aspirados de baço, constatou que ambos são eficientes no diagnostico da doença em cães naturalmente infectados. Esses dados são reforçados por BANETH et al. (2008) que também constataram que o material esplênico e o sangue são efetivos para a pesquisa de DNA erliquial em animais experimentalmente infectados, durante a fase aguda da doença.

2.2.5. Tratamento

Tetraciclina e doxiciclina são drogas de escolha para o tratamento da erliquiose canina e felina (WOODY e HOSKINS, 1991; BREITSCHWERDT et al., 2002; COHN, 2003; LAPPIN et al., 2004).

2.2.6. Epidemiologia

A *E. canis* é a única espécie descrita até o momento no Brasil, como agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). A primeira descrição da *E. canis*, compulsada na literatura é de um cão Pastor Alemão, na Argélia, por Donatien e Lestoquard, em 1935. O primeiro relato da presença de *E. canis*, no Brasil, ocorreu em Belo Horizonte, MG, por COSTA et al. (1973), sendo o segundo em Jaboticabal, São Paulo, em 1978 (KAVINSKI,1988).

Segundo MORAIS et al. (2002), LABARTHE et al. (2003) e BULLA et al. (2004) a doença no Brasil é considerada enzoótica, conforme as estimativas e dados recentemente obtidos. MORAIS et al. (2002) estimaram a prevalência da erliquiose canina em cerca de 20% em vários estados como, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Ceará, Alagoas, Pernambuco, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Já em estudo retrospectivo realizado por BULLA et al. (2004), no interior de São Paulo com 246 amostras, verificaram que 30,9% tinham a presença de *E. canis*, sendo considerada uma

doença enzoótica na cidade de Botucatu (SP), onde as condições climáticas favoreceram a disseminação do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

A ampla variação clínica da erliquiose, aliada ao longo período de portador dos cães e a natureza nidícola do *R. sanguineus*, contribuíram para a disseminação da *E. canis*, tornando-a uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas nos países tropicais, sobretudo no Brasil (HASEGAWA, 2005).

Estudos epidemiológicos sobre a infecção por *E. canis* no Brasil foram realizados avaliando os históricos clínicos, idade, sexo e raça dos cães e a presença de carrapatos, na tentativa de se estabelecer fatores de riscos para a doença (DAGNONE et al., 2003, SANTARÉM, 2003; TRAPP et al., 2006). Porém, ainda não há dados de prevalência da infecção por *E. canis* nas populações caninas do Brasil. Como houve uma grande expansão de populações do carrapato *R. sanguineus* nas últimas décadas é bem provável que a doença venha ocorrendo freqüentemente nos cães (LABRUNA e PEREIRA, 2001).

2.3. Babesiose canina

2.3.1. Agente etiológico

A babesiose é a infecção por protozoários parasitos apicomplexos intra-eritrocíticos pertencentes ao gênero *Babesia*, é uma das infecções mais comuns de animais de vida livre em todo o mundo. Embora capaz de infectar uma grande variedade de vertebrados, as babesias requerem hospedeiros vertebrados e invertebrados para a manutenção do seu ciclo de transmissão. Os parasitos replicam-se nas hemácias dos hospedeiros vertebrados e são chamados de piroplasmas devido à sua aparência de dupla pêra (HOMER et al., 2000).

Existem três subespécies de *B. canis* reconhecidas desse hemoparasito, que variam com base na distribuição geográfica, especificidade do vetor e propriedades antigênicas (UILENBERG et al. 1989). *Babesia canis rossi*, descrita na África do Sul, é transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi* e causa uma doença hemolítica severa e freqüentemente fatal em cães. *Babesia canis vogeli* é encontrada no Oriente Médio, Norte da África, Europa, Ásia, Austrália e América do Sul e é transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, induzindo normalmente uma doença de sinais clínicos moderados em cães. *Babesia canis canis*, descrita na Europa, é

transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* causa anemia hemolítica com variados graus de severidade e anormalidades da coagulação (UILENBERG et al., 1989; ZAHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005, ANDRÉ, 2008). No Brasil, confirmou-se molecularmente que os cães podem ser parasitados por *B. canis vogeli* (FURUTA, 2004; PASSOS et al., 2005) e *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006).

2.3.2. Transmissão e ciclo biológico

Em cães, a *Babesia canis*, assim como a *Ehrlichia canis*, é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é considerado reservatório para *B. canis vogeli*, mas não para *E. canis*. A presença de cães infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos já que não ocorre transmissão vertical nestes artrópodes (NEER, 1998). *B. canis vogeli*, entretanto, pode ser transmitida por via transovariana e repassada para a próxima geração de carrapatos na ausência de cães infectados (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003).

No momento do repasto sanguíneo o carrapato infectado inocula no cão, esporozoítas presentes nas glândulas salivares. Estes se aderem à membrana do eritrócito e, por endocitose, penetram na hemácia multiplicando-se por divisão binária, resultando na formação de merozoítos. Podem-se encontrar hemácias com até dezesseis merozoítos, porém, é mais comum, um ou par. Para que outras hemácias sejam parasitadas, os merozoítos deixam as células hospedeiras, encontrando-se livres na corrente sanguínea, por um curto período, e invadem outros eritrócitos (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998). Ao ingerir o sangue do cão parasitado, o carrapato infecta-se com eritrócitos contendo diferentes estágios evolutivos da *B. canis*. Nas células intestinais do carrapato, as formas não assexuadas se degeneram, e os gametócitos transformam-se em gametas e, então, em corpos raiados. Após a fusão dos gametas, masculino e feminino, os zigotos assim formados se transformam em cinetos móveis. Essas formas evolutivas atravessam a parede intestinal, caem na cavidade geral do artrópode e, por esporogonia, transformam-se em esporocinetos, infectando vários órgãos do carrapato, incluindo as glândulas salivares e ovários. A esporogonia continua nas glândulas salivares e nas larvas oriundas de ovos infectados, dando origem a

milhares de esporozoítos que serão transmitidos a outros hospedeiros por ocasião do repasto sanguíneo (KAKOMA e MEHLHORN, 1994; BORDEAU e GUELFY, 1995; TABOADA, 1998; MARQUARDT et al., 2000)

2.3.3. Sinais clínicos, laboratoriais e achados patológicos

A patogenicidade do parasito varia com a virulência da cepa, a primo-infecção ou re-infecção, número de parasitos e taxa de penetração do agente. A *Babesia* pode ser encontrada em todos os órgãos e tecidos do organismo. Desta forma, a patogenia e os sinais clínicos apresentados variam de acordo com o órgão afetado (REMO, 1998). A infestação por um número considerável de babesias no encéfalo ocasiona a formação de trombos nos capilares, e manifesta sinais de incoordenação, paresia, ataxia, convulsões, entre outros sinais clínicos (CORDERO, 2004).

A ação patogênica do parasito sobre os eritrócitos é do tipo mecânico, ocasionando a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue no momento em que acontece a divisão da *Babesia*. Além disso, ocorre fagocitose dos eritrócitos parasitados e não parasitados, facilitada pelo sistema complemento (BOOZER & MACINTIRE, 2003). O período de incubação varia entre 4 e 20 dias e nos animais jovens a doença se apresenta na forma aguda com um período pré-patente de 4 a 6 dias (HOMER, 2000).

A sua manifestação pode ser nas formas hiperaguda, aguda, subclínica e crônica. A hiperaguda está associada com choque hipotensivo, hipóxia, dano tecidual, estase vascular e óbito. A aguda é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia, linfadenomegalia, letargia, vômito, hematúria, icterícia, febre intermitente, anorexia e marcada perda de massa corporal (LOBETTI, 1998).

Os achados laboratoriais são caracterizados por anemia normocítica e normocrômica na fase inicial, que no transcorrer da doença se torna macrocítica, hiperocrômica regenerativa e trombocitopenia. Na bioquímica sérica, hipercalemia e hipoglicemia podem ser notados em animais severamente afetados. Azotemia, acidose metabólica, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hemoglobínúria e proteinúria são achados nos exames bioquímicos (LOBETTI, 1998).

Apresentam como achados patológicos, a pigmentação dos tecidos com hemoglobina e bilirrubina, hepato-esplenomegalia, linfadenopatia, edema e hemorragia (decorrente de injúria vascular e deficiente oxigenação), eritrócitos

parasitados nas redes capilares (principalmente cerebrais), microtrombos em casos de coagulação intravascular disseminada, vasculite, etc (LOBETTI, 1998).

2.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico clínico não é confiável dado que nenhum dos sinais é patognomônico e podem se apresentar em qualquer doença. Os métodos diagnósticos utilizados incluem a detecção direta ou indireta do parasito. A detecção direta, que ocorre pela presença de merozoitos nas hemácias em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, Field's ou Wright's (CLEVELAND et al., 2004) considerada prova específica, mas de baixa sensibilidade, já que a parasitemia é de período variável (GREENE, 2006).

O diagnóstico indireto pela RIFI é considerado o teste de referência, por ser sensível (OLIVERA & GUIMARÃES, 2002), porém a especificidade é baixa, pois podem ocorrer reações cruzadas entre as espécies de *Babesia* (VIDOTTO & MANDUCCA, 2004). No Brasil, FURUTA et al. (2009) padronizaram e compararam os testes de ELISA e RIFI na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis* na cidade de Jaboticabal/SP, evidenciando maior positividade no teste de ELISA (67%) em comparação ao RIFI (59%), evidenciando maior sensibilidade no teste ELISA.

A PCR detecta fragmentos de DNA de *Babesia spp.* e proporciona o diagnóstico de infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo nos casos de baixa parasitemia. A PCR também pode ser utilizada para monitoramento de terapia, detecção de animais portadores e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica deste patógeno (VIDOTTO et al., 2004; CLEVELAND et al., 2004).

2.3.5. Tratamento

Diaceturato de dimiazeno (2,5-3,5 mg/kg, SC ou IM, dose única) e dipropionato de imidocarb (5-7 mg/kg, SC ou IM, 2 doses intervaladas de 2 semanas) são as drogas mais frequentemente utilizadas para tratamento da babesiose canina no Brasil (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006).

2.3.6. Epidemiologia

Ainda existem poucos relatos sobre a epidemiologia de *Babesia canis* no Brasil. O'DWYER et al. (2001), estudando cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, diagnosticaram *B. canis* em 5,2% dos cães por meio do esfregaço sangüíneo. ALMEIDA et al. (2002) compararam a ocorrência de babesiose e erliquiose entre os cães de rua e domiciliados, no município de Campos dos Goytacazes-RJ, e verificaram que, aqueles apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses foram significativamente mais positivos para esses hematozoários do que os domiciliados. MOURA et al. (2002) verificaram por meio da técnica de esfregaço sangüíneo, que 50% das hemoparasitoses identificadas nos cães atendidos pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade de Cuiabá, eram devido à *B.canis*, apesar desta detecção ter ocorrido em somente 2,5% dos animais. SALGADO (2005) realizou esfregaços de sangue periférico e venoso em 167 animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS, e constatou que 10,78% das amostras evidenciaram positividade para *Babesia canis*.

2.4. Co-Infecções

Durante todo seu tempo de vida, os seres vivos entram em contato com diferentes parasitos, de modo sequencial ou simultâneo e raramente a interação parasito-hospedeiro envolve somente um e outro. Podem existir situações em que ocorram concomitantemente infecções por diferentes amostras de uma mesma espécie, diferentes espécies de um mesmo gênero, ou ainda, parasitos de grupos taxonômicos distintos (COX 2001; MCKAY 2006). Embora pouco considerado, este é um aspecto básico do fenômeno parasitismo uma vez que dependendo da dinâmica da associação, um ou outro parasito pode ser favorecido ou desfavorecido ou ainda, ambos podem não ser afetados nesta relação. Do mesmo modo, os parasitos co-ocorrendo podem causar prejuízo ou benefício ao hospedeiro (GRAHAM 2007).

Parasitos têm uma notável competência para suprimir e/ou desviar a resposta imune do hospedeiro, com mecanismos tão diversos quanto os nichos que ocupam (PFAFF & CANDOLFI 2003). Ainda, as inter-relações são complexas e dependem de variáveis pertencentes ao meio, ao hospedeiro e ao parasito (FERREIRA 1973, ARAÚJO E COLS. 2003). Assim, podemos observar que em algumas associações

ocorre um sinergismo, como o que ocorre com vírus da imunodeficiência felina, que agrava o quadro da sarna causada por *Demodex* (CHALMERS E COLS. 1989) ou em caprinos infectados por *T. brucei*, os quais se tornam mais susceptíveis a infecção por *Haemonchus contortus* (CHIEJINA E COLS. 2005). Entretanto, algumas relações de co-existência parasitária podem evoluir para um antagonismo, como na infecção por *Babesia* spp. que é suprimida em camundongos infectados experimentalmente com estágios larvais de *Heligmosomoides polygyrus* (MZEMBE E COLS. 1984). Porém, em outras relações podemos ter duas resultantes, é o caso da infecção pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) que pode ou não reativar a infecção por *Toxoplasma gondii* (WITT E COLS. 1989; LIN & BOWMAN 1992). Também, a presença de dois ou mais agentes infecciosos pode originar uma condição patológica a qual pode não ter relação alguma com os patógenos, como é o caso de pacientes com o vírus Epstein Barr, quando expostos ao *Plasmodium* spp., que podem desenvolver linfoma de Burkitt (DE THE 1985). A eliminação de dois parasitos de um hospedeiro co-infectado pode também ocorrer, assim, os mecanismos imune-efetores que induzem a eliminação de *Babesia microti* do sangue de camundongos eliminam também a infecção concomitante por *Plasmodium vinckei* (COX 1978).

Existe também uma complexa relação entre o estado nutricional do hospedeiro, respostas imunológicas, intensidade da infecção e prevalência de doenças. Má nutrição (proteica/energética) é considerada a causa mais importante de imuno-deficiência secundária e de alta prevalência de infecções e doenças. Por outro lado, as infecções por si mesmas podem induzir a má nutrição através de anorexia, febre ou patologias diversas. Parasitos que causam imunossupressão favorecem a sobrevivência de um segundo organismo infectante em algumas situações, pelo menos temporariamente (LLOYD 1995).

A ocorrência de múltiplas espécies de parasitos em um único hospedeiro pode ter importantes consequências para a trajetória coevolucionária de seus participantes (BUCK E COLS. 1978, PETNEY & ANDREWS 1998). Entretanto, as informações de campo disponíveis estão relacionadas principalmente ao estabelecimento de espécies de parasitos após a EXPOSIÇÃO (DÁVILA E COLS. 2003, HERRERA E COLS. 2007 E 2008). Assim, a resultante da interação entre a infecção natural promovida por organismos distintos quanto à saúde do hospedeiro,

bem como à sobrevivência de um ou outro patógeno constitui, ainda, uma lacuna no conhecimento das coinfeções (GRENFELL & DOBSON 1995; COX 2001).

A infecção dos cães pela leishmaniose visceral canina (LVC), *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* coexistem, devido à atividade de seus vetores e períodos de transmissão serem semelhantes, como também a abundância de artrópodes vetores e cães nas áreas endêmicas. Considerando que a *E. canis* e a *B. canis vogeli* são transmitidas principalmente por carrapatos da espécie, *Rhipicephalus sanguineus*, e *L.chagasi* por flebotomíneos, ambos disseminam agentes infecciosos a partir da pele para o fígado, baço e medula óssea, e ativam mecanismos imunes que induzem várias respostas imunopatológicas (MEKUZAS et al, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico sorológico e molecular de parasitos do gênero *Leishmania*, *Ehrlichia* e *Babesia* em amostras de soro e de baço, respectivamente, de 60 cães naturalmente infectados oriundos do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

3.2. Objetivos Específicos

- Investigar simultaneamente a ocorrência de anticorpos anti-*E. canis*, anti-*B. canis vogeli* e anti-*Leishmania chagasi* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em amostras de soros dos animais;
- Investigar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelo teste imuno-enzimático em amostras de soros dos animais;
- Detectar o DNA de *E. canis*, *Babesia sp.* e *Leishmania chagasi* a partir de fragmentos de tecidos esplênicos pela reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR);
- Seqüenciar as amostras positivas da PCR e compará-las com seqüências depositadas no GenBank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa BLAST.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de coleta

As amostras foram coletadas de 60 cães soro-positivos para LVC encaminhados à eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses no município de Campo Grande – MS.

4.2. Diagnósticos sorológicos

A pesquisa de anticorpos da classe IgG foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP.

4.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

4.2.1.1. RIFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*

A RIFI foi realizada conforme técnica padronizada por OLIVEIRA et al (2008), para diagnóstico de animais infectados por *Leishmania chagasi*.

4.2.1.2. Cultivo do antígeno

O meio de cultura em que se encontravam os parasitos foi centrifugado a 735 rpm, por dez minutos, e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram feitas três lavagens dos parasitos em PBS pH 7,2 a 0,01M.

Após a terceira lavagem, foi colocada uma solução de paraformaldeído a 4%, por 30 minutos, para a fixação dos parasitos. Com a fixação, os parasitos foram novamente lavados por três vezes com solução de PBS, e o “pellet” de parasitos foi ressuspendido em solução salina tamponada (PBS) até a concentração de 3×10^6 a 4×10^6 parasitos por mL.

Utilizando lâminas previamente demarcadas com círculos, foram colocados 10 µL da suspensão de parasitos em PBS em cada círculo de modo a ter de 20 a 30 por campo microscópico, com objetiva de 40x. Após secagem por 6 a 8 horas à

temperatura ambiente, as lâminas foram devidamente embaladas em papel extra-fino e papel alumínio, e estocadas a -20°C , em recipiente hermeticamente fechado, até o momento de uso.

4.2.1.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania chagasi*

As lâminas preparadas foram retiradas do “freezer” e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno, foram dispensados 10 μL de cada soro teste, diluído na concentração de 1:40. As lâminas foram então incubadas, em câmara úmida a 37°C , por 30 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão, de cinco minutos cada. Após secagem à temperatura ambiente, os círculos da lâmina foram recobertos com 10 μL do anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, diluído a 1:32, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M de pH 9,6 e, posteriormente, observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus, BX-FLA).

As amostras séricas positivas na diluição de 1:40 foram novamente testadas. Em cada círculo contendo o antígeno, foram dispensados 10 μL das diluições sucessivas dos soros testes positivos. A titulação dos soros teste positivos foi realizada diluindo-se cada soro a partir de 1:40, base 2, até a negatificação do mesmo. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes com soros na diluição $\geq 1:40$.

4.2.1.4. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de *Ehrlichia canis*

O antígeno de *E. canis* usado para confecção de lâminas de RIFI foi obtido à partir de cultura de células DH82 (derivadas de histiocitoma canino) infectadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO em 1993 a partir de um cão, fêmea, da raça Weimaraner, em fase aguda da doença (AGUIAR et al., 2007).

4.2.1.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis*

As amostras de soro foram diluídas a 1:64 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na₂HPO₄; 10 mM KH₂PO₄; 9,2 mM NaH₂PO₄). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço da lâmina com antígeno de *E. canis*, reservando-se dois poços para a adição das amostras de soros controle positivo e negativo. Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos frente ao antígeno de *E. canis*. O procedimento foi o mesmo para cada lâmina a ser testada. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida.

Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (1,37 M NaCl; 26,82 mM KCl; 101,44 mM Na₂HPO₄; 17,63 mM KH₂PO₄), secas e a cada poço adicionados 10 µL de conjugado anti-IgG de cão, marcado pelo isotocianato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão, diluído conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi então incubado por mais 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas na microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:64 (ANDRÉ, et al., 2010). A positividade da reação implicou na observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (RISTIC et al., 1972; NAKAGHI et al., 2008).

4.2.1.6. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de *Babesia canis*

O antígeno proveio da inoculação, em cães, de uma cepa de *B. canis*, isolada por MACHADO 3 (1999), a partir de um cão atendido no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP Jaboticabal. Previamente à inoculação, se realizou a PCR com oligonucleotídeos iniciadores para *B. canis*, cujo produto foi clivado com as endonucleases de restrição Hinf I e Taq I, obtendo-se assim um padrão de clivagem compatível com *B. canis vogeli* (FURUTA, 2004).

Dois cães, com aproximadamente três meses de idade, mantidos livres de ectoparasitos através do isolamento e utilização periódica de Fipronil®, vacinados contra as principais doenças infecciosas caninas com vacinas comerciais (FortDodge®) e desverminados (Bayer®) foram mantidos no canil do Departamento

de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos à esplenectomia com o objetivo de baixar a resistência imunológica e facilitar a visualização dos parasitos nos esfregaços sangüíneos. Quatro dias após o procedimento cirúrgico, aproximadamente 8 mL de sangue (mantido criopreservado em igual volume com dimetilsulfóxido (DMSO) em nitrogênio líquido) originário de cão parasitado com *B. canis*, foi descongelado em banho-maria a 37°C. Procedeu-se então, a inoculação experimental de um dos cães com o sangue parasitado através da via endovenosa.

O animal foi então submetido a avaliações diárias da sua condição física, temperatura retal e avaliação da parasitemia por meio de punções de sangue capilar, obtido da área marginal da orelha, três vezes ao dia, até se obter a parasitemia desejada (25%), no 5º dia pós-infecção. A pesquisa por parasitos era feita através da coloração de esfregaços sangüíneos finos corados com Giemsa (Sigma®). Uma vez obtida a parasitemia desejada, colheu-se cerca de 10 mL de sangue parasitado em frascos com EDTA sódico a 7,5% como anticoagulante, procedendo-se à lavagem das hemácias com solução salina tamponada por 3 vezes. Com a papa de hemácias, foram realizados esfregaços sangüíneos finos em lâminas previamente lavadas e desengorduradas em álcool/éter (70%/30%), as quais foram utilizadas como antígeno para a realização da RIFI para *B. canis*. Após secarem em temperatura ambiente, foram embrulhadas (individualmente) em papel absorvente extrafino, envoltas em papel alumínio e acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado a -20°C até o momento do uso. Parte do sangue do animal parasitado (20 mL) foi transferido para o outro cão esplenectomizado, o qual apresentou pico de parasitemia 1 dia após a inoculação. Colheu-se 10 mL de sangue parasitado para confecção de novas lâminas para RIFI, para preservação com DMSO em nitrogênio (-196°C) líquido e para extração de DNA (controle positivo para as reações de PCR). Após a colheita, os animais foram submetidos à fluidoterapia para o restabelecimento da volemia, e administrando-se dipropionato de imidocarb (5,0 mg/kg), por via subcutânea, para o tratamento da babesiose.

4.2.1.7. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia canis*

As amostras de soros foram diluídas a 1:40 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6 mM Na₂HPO₄; 1,0 mM KH₂PO₄; 0,8 mM NaH₂PO₄). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço da lâmina com antígeno de *B. canis*. Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos frente ao antígeno de *B. canis*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 45 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (1,37 M NaCl; 26,82 mM KCl; 101,44 mM Na₂HPO₄; 17,63 mM KH₂PO₄), secas e a cada uma adicionados 10 µL de conjugado anti-IgG de cão, marcado pelo isotocianato de fluoresceína para as amostras testes, diluído conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi então incubado por mais 45 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram consideradas positivas às reações em que toda a periferia do parasito apresentou fluorescência, a partir da diluição de 1:40, comparativamente as amostras de soro controles positivo e negativo (FURUTA, 2004).

4.2.2. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste)

O teste de ELISA indireto para *L. chagasi* foi realizado de acordo com técnica descrita por MACHADO et al. (1997) para *B. bovis*, com pequenas modificações descritas por OLIVEIRA et al. (2008).

4.2.2.1. Preparação do antígeno total solúvel de *Leishmania chagasi*

Os parasitos em meio de cultura foram centrifugados a 3.000 rpm (Sorwall), por dez minutos, e o sobrenadante, descartado. Posteriormente, foram feitas duas lavagens dos parasitos com PBS. Após as lavagens, os parasitos na concentração de 2 x 10⁶/mL, foram ressuspensos em tampão de homogeneização e armazenados a -70°C.

A suspensão de parasitos armazenada foi então submetida a sete ciclos de congelamento à -70°C, seguidos de descongelamento à 37°C. A suspensão resultante foi centrifugada a 3.000 rpm, durante 3 horas à 4°C, alíquotas de 500mL

do sobrenadante foram congeladas a -70°C , até o momento do uso. O conteúdo protéico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicincônico, utilizando-se o “Kit” de reagentes BCA (BCA Reagents Kit-Pierce Chemical Company), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.2.2. Descrição da reação

Foram adicionados 100 μL do antígeno solúvel *de L. chagasi*, diluído na concentração de 10 mg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6 em cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nunclon TM Surface, Nunc. Denmark). Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4°C , o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a 37°C por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata, 100 μL dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos diluídos 1:400 em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas a 37°C por 90 minutos e lavadas, como descrito anteriormente; 100 μL do conjugado canino acoplado a fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de cão, Sigma A-0793), diluído 1:4.000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de soro de coelho, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

4.3. Testes moleculares

O diagnóstico molecular foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Patologia Veterinária.

4.3.1. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.3.1.1. Extração de DNA de tecido esplênico

A extração de DNA de tecido esplênico foi realizada com o QIAamp DNA Blood and tissue Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20°C para realização da PCR.

4.3.1.2.1. Seleção dos primers para *Leishmania* spp e *L. chagasi*.

Os primers utilizados para a PCR de *Leishmania* spp (L₁ e L₂), foram aqueles descritos por MICHALSKY et al. (2002). Para os animais que foram PCRs positivos para o gênero *Leishmania* sp, repetiu-se a PCR, mas desta vez com os primers MC1 e MC2, específicos para o complexo *L. Donovanii*, conforme descrito por CORTES et al. (2004).

L1: (5' – GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA – 3')

L2: (5' – GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC – 3')

MC1: (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3')

MC2: (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3')

4.3.1.2.2. Amplificação de DNA de *Leishmania* sp

A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl, pH 8,4), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 4 µL de dNTP's (10 mM cada), 5 µL de cada primer (10 pmol/ µL), 0,25 µL de Taq (5 U/ µL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 45 µL e 5 µL de DNA (10ng/ µL). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (MJ Research – PTC 200) com ciclos de: 1 ciclo: D: 94° C (5 min); A: 65°C (1 min); E: 72°C (1 min) e 29 ciclos: D: 94°C (1 min); A: 65°C (1 min); E: 72°C (1 min); Efinal: 72°C (5 min).

4.3.1.2.3. Amplificação de DNA de *Leishmania chagasi*

A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl, pH 8,4), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 4 µL de dNTP's (10 mM cada), 5 µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,25 µL de Taq (5 U/ µL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 45 µL e 5 µL de DNA (10ng/ µL). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (MJ Research – PTC 200) com ciclos de: 1 ciclo: D – 94°C (2 min) e 30 ciclos: D – 94°C (20 seg); A – 60°C (20 seg); E – 72°C (30 seg); Efinal – 72°C (5 min).

4.3.1.3. Amplificação do DNA da espécie *Babesia canis*

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene da subunidade menor do 18S rDNA presente na maioria das espécies de babesias: Piro A (5'- AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e Piro B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por CARRET et al. (1999). A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

4.3.1.4.1 Reação de Amplificação para *Ehrlichia spp.* baseada no gene dissulfito oxidoreductase (dsb)

Os primers utilizados na PCR para *Ehrlichia spp* foram baseados no gene dsb. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores dsb-330 e dsb-728, que amplificam um fragmento de 409 pb de *Ehrlichia spp.* (DOYLE et al., 2005). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 50µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada 50 µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 50 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

dsb-330 (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3')

dsb-728 (5'- CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3')

4.3.1.4.2. Amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis*

A reação de amplificação do tipo nested para *E. canis* foi realizada utilizando-se os produtos obtidos da primeira amplificação (para gênero) como moldes para os primers para as próximas reações. Para as reações específicas para *E. canis* foram utilizados os primers ECAN5 (5'CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA 3') e HE3 (5'TATAGGTA CCGTCATT ATCTTCCCTAT-3').

Para a reação da nested PCR foram utilizadas as mesmas soluções da PCR, além de 1µL da amostra de DNA amplificado e os primers espécie-específicos. A reação consistiu de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72 °C (MURPHY et al., 1998).

4.3.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (Invitrogen®) (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb DNA Ladder -Invitrogen®). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®).

4.4. Seqüenciamento

4.4.1. Extração dos Amplímeros do Gel de Agarose

Após a reação de PCR, as bandas referentes a cada amplímero foram cortadas do gel de agarose com lâmina de bisturi estéril, pesadas e colocadas em tubos de polipropileno de 2,0mL devidamente identificados. Na seqüência, foi realizada extração do produto da PCR em gel de agarose, utilizando-se o Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Life Sciences[®], São Paulo, SP) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.2. Quantificação de DNA dos amplímeros

A quantificação de material purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop[®], Thermo Scientific,), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.4.3. Seqüenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados e purificados foi realizado através do método automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977). Para o sequenciamento dos produtos diretos da PCR, utilizaram-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR. Para o sequenciamento de produtos amplificados clonados, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores T7 (TAATACGACTCACTATAGG) e SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG), na concentração de 1µM os quais flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM T-easy. O protocolo da reação de seqüenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5 µL do Tampão 2,5x (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂); 0,5 µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra-pura e 1,5 µL de DNA (sendo este ajustado de acordo com sua concentração, mensurada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific). As amplificações foram realizadas inicialmente no termociclador (MJ Research-Inc).

O processo de lavagem das amostras foi feito adicionando-se 80µL Isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 70% foram adicionados e a placa novamente centrifugada, desta feita, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de etanol 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração 1) e em seguida colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. O seqüenciamento foi conduzido no seqüenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp- Campus de Jaboticabal).

4.4.4. Análise das Seqüências

Após seqüenciamento, as seqüências obtidas foram analisadas e confrontadas com aquelas já publicadas no GenBank, onde foram verificadas similaridades entre elas através do programa BLAST (BENSON et al., 2002). O programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) é utilizado para localizar alinhamentos entre uma sequencia de interesse pesquisada e dados existentes publicados no GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast>) (BENSON et al.,2002). Para analisar as similaridades entre as sequencias dos fragmentos de DNA de *E. canis*, *Babesia* sp e *Leishmania* (complexo Donovanii) amplificados (obtidas a partir das amostras de tecido esplênico de cães) entre si e com aquelas depositadas no GenBank foram utilizados, respectivamente, os programas “BLAST 2 sequences” e “nucleotide BLAST”.

5. RESULTADOS

5.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

5.1.1. Soropositividade para *Leishmania chagasi*

Das 60 amostras de cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de CG/MS, coletadas 60(100%) mostraram soropositividade frente ao antígeno total de promastigotas de *L. chagasi*. O título de anticorpos desses animais variou de 1: 40 a 1: 20480 (Tabela 1).

5.1.2. Soropositividade para *Ehrlichia canis*

O número de animais sororeagentes frente ao antígeno de *E. canis* foi menor em relação aos reagentes a *L. chagasi*. Dos animais amostrados 39 (65%) apresentaram anticorpos anti-*E.canis*, com títulos variando de 1: 64 a 1: 2048. (Tabela 2).

5.1.3. Soropositividade para *Babesia canis*

Dos animais naturalmente infectados, 49 (81,6%) mostraram-se soropositivos para *Babesia canis*, com títulos variando de 1:40 a 1:5120 (Tabela 3).

Tabela 1: Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti-*L chagasi* em cães naturalmente infectados coletados no CCZ/CG/MS.

Titulação	NºAnimais	%
1/40	1	1,6
1/160	2	3,3
1/320	4	6,6
1/640	9	15
1/1280	8	13,3
1/2560	12	20
1/5120	16	26,6
1/10240	6	10
1/20480	2	3,3
Total	60	100

Tabela 2: Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti-*E. canis* em cães naturalmente infectados coletados no CCZ/CG/MS.

Titulação	NºAnimais	%
1/64	11	28,2
1/128	8	20,5
1/256	6	15,3
1/512	3	7,6
1/1024	5	12,8
1/2048	6	15,3
Total	39	100

Tabela 3: Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti-*B. canis* em cães naturalmente infectados coletados no CCZ/CG/MS.

Titulação	NºAnimais	%
1/40	2	4
1/80	3	6
1/160	4	8
1/320	3	6
1/640	9	18,3
1/1280	8	16,3
1/2560	11	22,4
1/5120	9	18,3
Total	49	100

5.1.4. Co-soropositividade para *L.chagasi*, *E. canis* e *B. canis*

Das 60 amostras de cães 65% (39) mostraram-se soropositivos tanto para *L. chagasi* quanto para *E.canis* (Tabela 4), 43,33% (26) foram sororeagentes para *L. chagasi* e *B. canis* (Tabela 5), 33,3% (20) mostraram-se sorologia positiva para *E.canis* e *B.canis* (Tabela 6). Vinte animais foram co-soropositivos para *L.chagasi*, *E.canis* e *B. canis*.

Tabela 4: Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de *L. chagasi* e *E. canis* coletados no CCZ/CG/MS.

	Animais soropositivos a <i>E. canis</i>	Animais soronegativos para <i>E. canis</i>	Total
Animais soropositivos para <i>L.chagasi</i>	39	21	60
Animais soronegativos para <i>L.chagasi</i>	0	0	0
Total	39	21	60

Tabela 5: Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de *L. chagasi* e *B. canis* coletados no CCZ/CG/MS.

	Animais soropositivos a <i>B. canis</i>	Animais soronegativos para <i>B. canis</i>	Total
Animais soropositivos para <i>L.chagasi</i>	49	11	60
Animais soronegativos para <i>L.chagasi</i>	0	0	0
Total	49	11	60

Tabela 6: Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de *E. canis* e *B. canis* coletados no CCZ/CG/MS.

	Animais soropositivos a <i>E. canis</i>	Animais soronegativos para <i>E. canis</i>	Total
Animais soropositivos para <i>B.canis</i>	34	15	49
Animais soronegativos para <i>B.canis</i>	5	6	11
Total	39	21	60

5.2. Teste de ELISA Indireto para *Leishmania chagasi*

Utilizou-se a diluição única de 1:400 para os soros de referência positivos e negativos e o conjugado na diluição de 1:4.000. Nessas condições, a absorbância média de soros negativos (n=17) foi de 0,0933, resultando em um ponto de corte calculado de 0,233. Os valores de densidade óptica média (DO) foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove), como descrito por Machado et al. (1997). O ponto de corte foi determinado em $NE \geq 3$, ou seja, todo soro com NE igual ou maior a 3 é considerado positivo, sendo considerado negativo o soro com NE abaixo de 3. A seguir, está apresentada a escala de níveis de ELISA (NE).

Tabela 7: Distribuição dos soros de animais naturalmente infectados por *L.chagasi* coletados no CCZ/CG/MS em níveis de ELISA

NE	Valor da absorbância
0	0,000 – 0,118
1	0,119 – 0,159
2	0,160 – 0,214
3	0,215 – 0,289
4	0,290 – 0,390
5	0,391 – 0,526
6	0,527 – 0,710
7	0,711 – 0,958
8	0,959 – 1,293
9	$\geq 1,294$

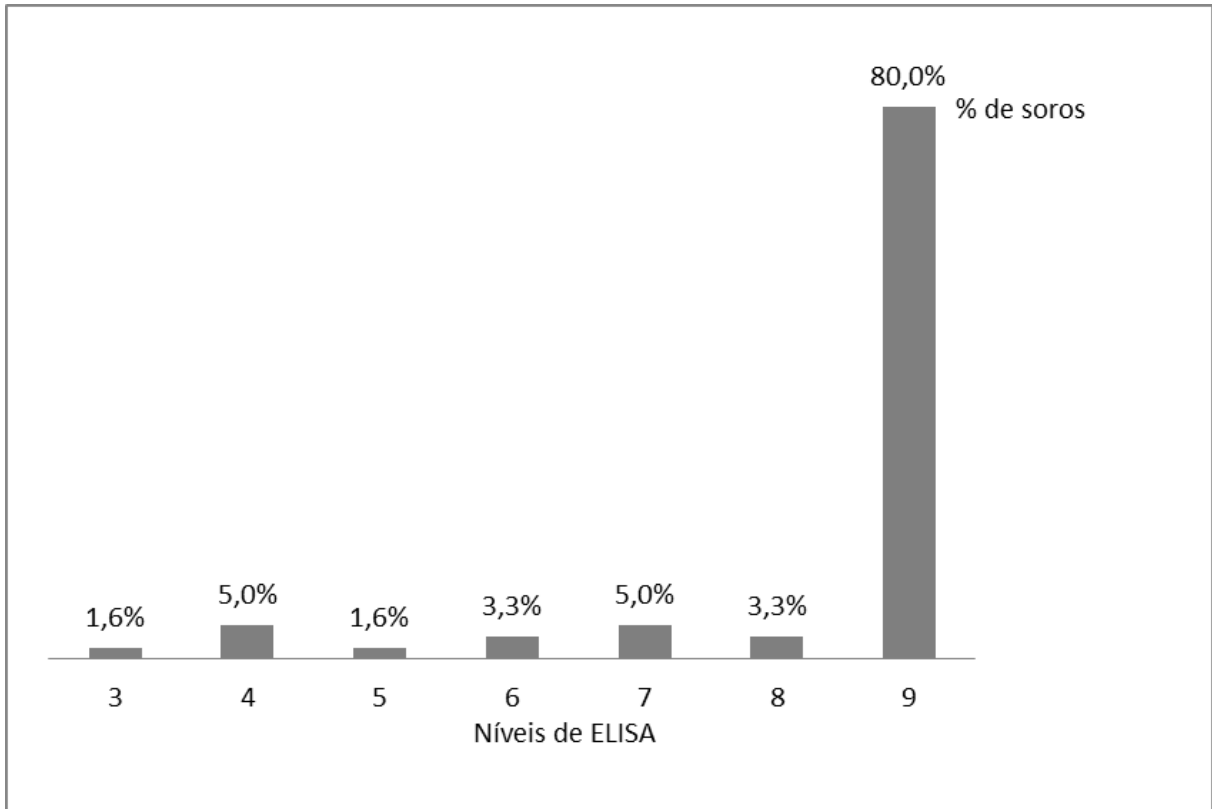
O ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) foi realizado para as amostras de soro dos cães do centro de controle de zoonoses. Os resultados corroboraram a imunofluorescência indireta (RIFI), ou seja, os mesmos animais positivos para a RIFI também o foram para o ELISA teste.

O valor da densidade óptica e os níveis de ELISA estão apresentados na Tabela 7. No ELISA, os níveis variaram de 2 a 9. (Figura 1).

Tabela 8. Resultados de absorvância, níveis de ELISA e titulações da RIFI

Animal	D.O	N.E	RIFI Titulação	Animal	D.O	N.E	RIFI Titulação
1	2,116	9	1:2560	31	2,853	9	1:5120
2	2,105	9	1:10240	32	2,005	9	1:2560
3	2,699	9	1:5120	33	2,932	9	1:5120
4	2,751	9	1:5120	34	0,896	7	1:640
5	1,86	9	1:2560	35	2,532	9	1:10240
6	0,244	3	1:320	36	0,547	6	1:640
7	1,32	9	1:1280	37	2,333	9	1:5120
8	2,357	9	1:5120	38	2,44	9	1:5120
9	2,65	9	1:1280	39	2,959	9	1:5120
10	0,983	8	1:640	40	3,076	9	1:2560
11	2,591	9	1:20480	41	1,798	9	1:5120
12	1,477	9	1: 5120	42	0,352	4	1:320
13	0,386	4	1:320	43	2,74	9	1:5120
14	1,992	9	1:1280	44	3,12	9	1:5120
15	2,784	9	1:1280	45	1,484	9	1:1280
16	2,226	9	1:640	46	2,23	9	1:10240
17	2,916	9	1:1280	47	0,496	5	1:40
18	2,161	9	1:640	48	0,714	7	1: 640
19	2,75	9	1:640	49	1,913	9	1:1280
20	2,386	9	1:5120	50	2,161	9	1:1280
21	1,841	9	1:2560	51	2,036	9	1:2560
22	2,656	9	1:5120	52	0,66	6	1:160
23	1,819	9	1:5120	53	2,289	9	1:10240
24	1,249	8	1:5120	54	1,46	9	1: 2560
25	1,861	9	1:2560	55	1,775	9	1:10240
26	2,329	9	1:2560	56	0,917	7	1:2560
27	2,282	9	1:640	57	1,918	9	1:10240
28	2,011	9	1:2560	58	2,352	9	1:320
29	2,438	9	1:20480	59	0,291	4	1:160
30	2,455	9	1:2560	60	2,555	9	1:640

Figura 1: Distribuição dos soros positivos, em níveis de ELISA (0-9), submetidos ao teste ELISA para a detecção de anticorpos anti-*L. chagasi*.



5.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

5.3.1. PCR para *Leishmania chagasi*, *E. canis* e *B. canis*.

Dos 60 animais amostrados, 54 (90%) mostraram-se positivos na PCR para o gênero *Leishmania* (Figura 2), e destes 53 (88,3%) foram positivos para o complexo *L. Donovanii*, (Figura 3). Vinte e sete animais (45%) foram positivos para *Ehrlichia sp* (Figura 4) e destes animais todos foram positivos para *E.canis* pelo nested PCR (Figura 5), 2 (3,33%) foram positivos para *Babesia sp.*(Figura 6).

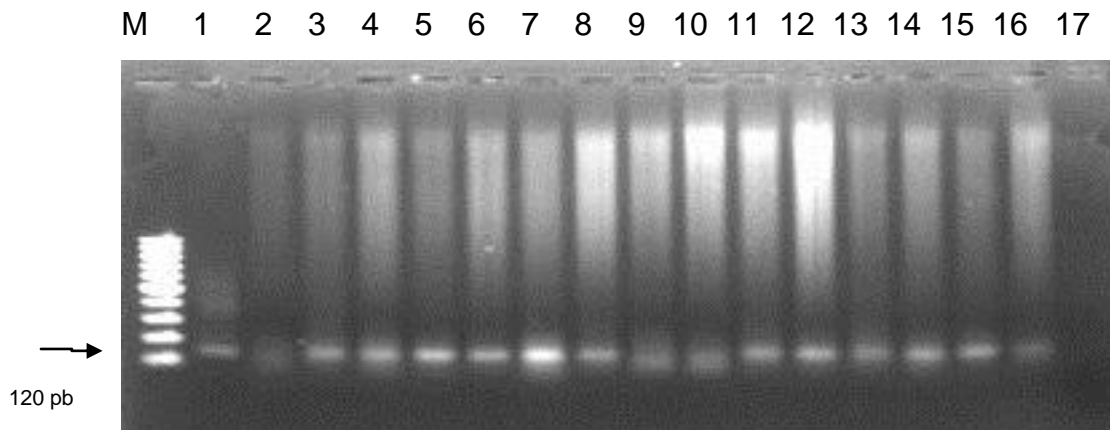


Figura 2: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídeo. Os ampliceros mostrados na foto são relativos à PCR para *Leishmania* spp obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores L1 e L2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.

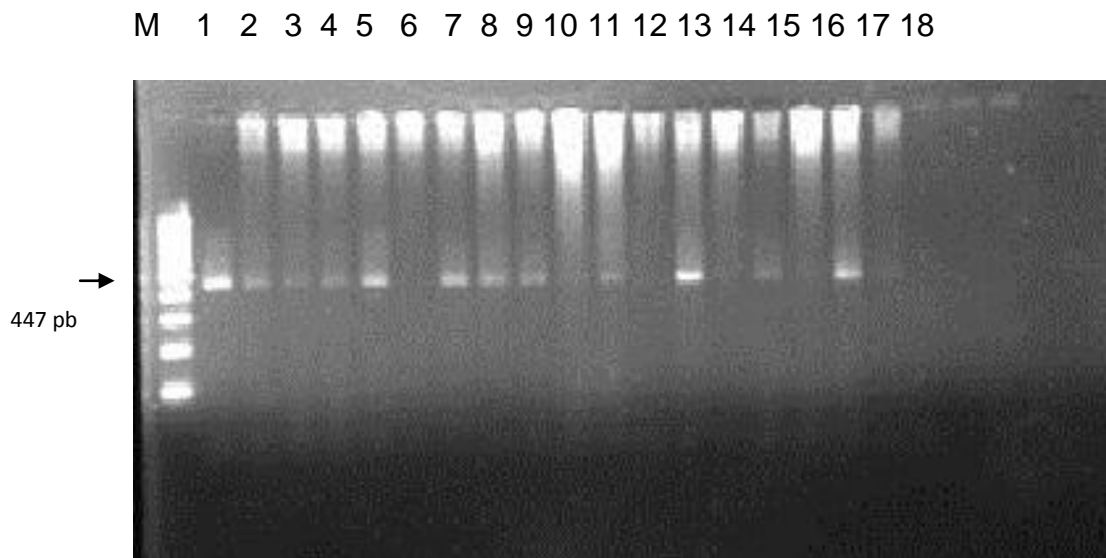


Figura 3: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídeo. Os ampliceros mostrados na foto são relativos à PCR para o complexo *L. Donovanii* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores MC1 e MC2. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 18: controle negativo.

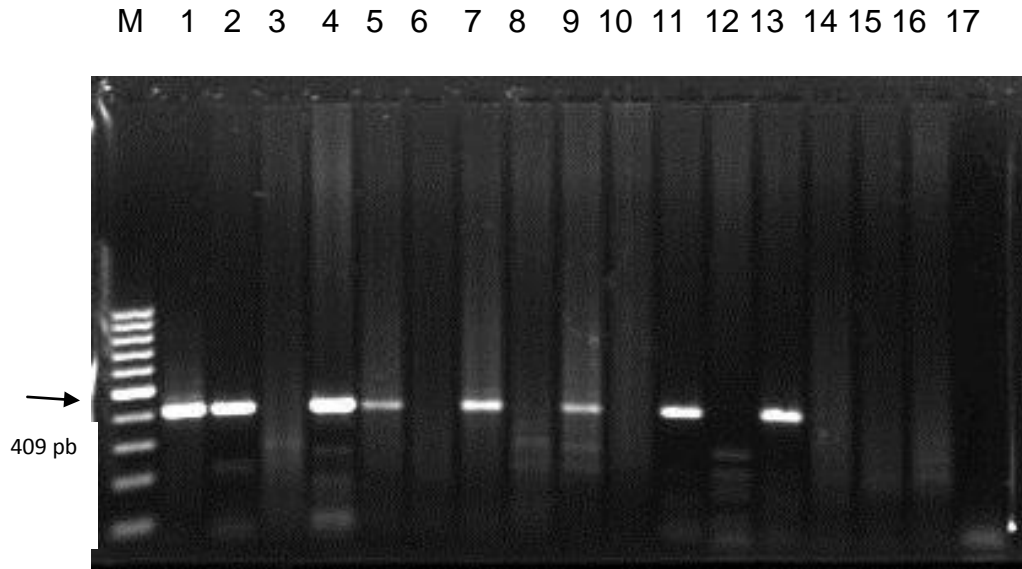


Figura 4: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Ehrlichia* sp obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores dsb-330 e dsb-728. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo.

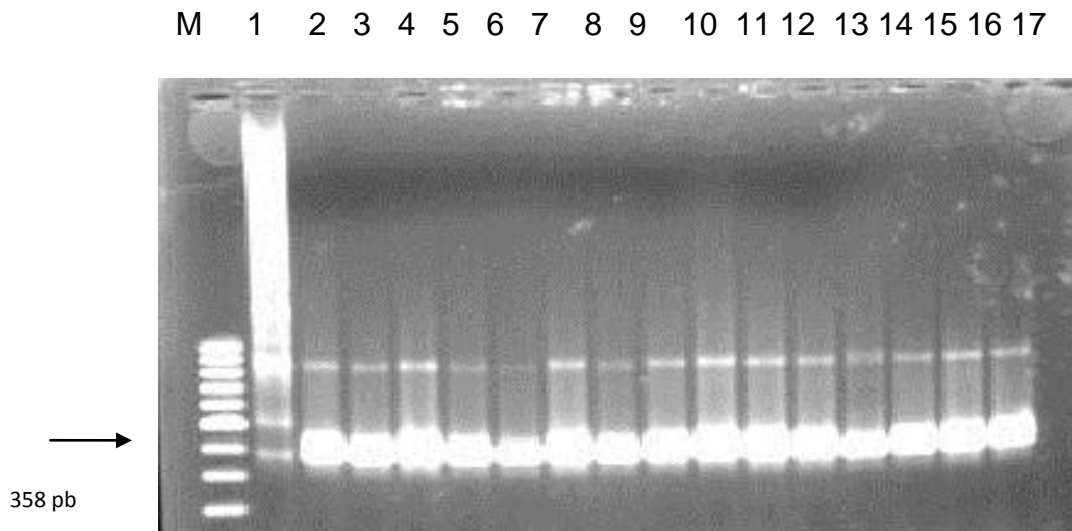


Figura 5: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *Ehrlichia canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN5 e HE3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo

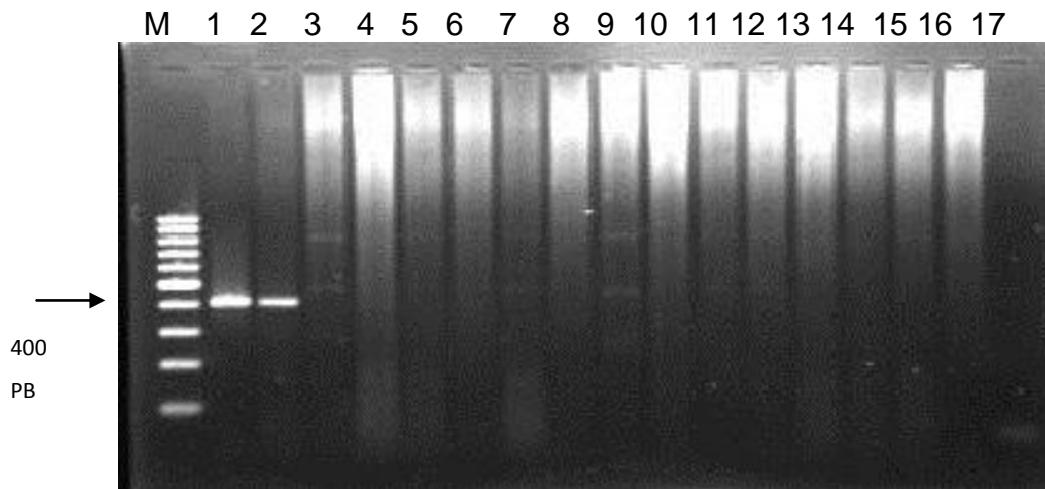


Figura 6: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídeo. Os amplicímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Babesia* sp obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores Piro A e Piro B. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo, demais canaletas animais amostrados. Canaleta 17: controle negativo

5.3.2. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para *Leishmania* spp.

Dos 60 animais amostrados, 54 foram PCR positivos e sororeagentes. Seis animais foram soropositivos, porém PCR negativos (Tabela 8).

Tabela 9: Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para *Leishmania* spp para os cães amostrados.

	Animais sororeagentes para <i>Leishmania chagasi</i>	Animais não-sororeagentes para <i>Leishmania chagasi</i>	Total
Animais positivos na PCR para <i>Leishmania</i> sp	54	0	54
Animais negativos na PCR para <i>Leishmania</i> sp	6	0	6
Total	60	0	60

5.3.3. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para o complexo

L. Donovanii

Dos animais amostrados, 53 se mostraram positivos na PCR para o complexo *L. Donovanii*. Sete animais apresentaram-se soropositivos, porém PCR negativos (Tabela 9).

Tabela 10: Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para *L. Donovanii* para os cães amostrados.

	Animais sororeagentes para <i>L.chagasi</i>	Animais não-sororeagentes para <i>L.chagasi</i>	Total
Animais positivos na PCR para c. <i>L.Donovani</i>	53	0	53
Animais negativos na PCR para c. <i>L.Donovani</i>	7	0	7
Total	60	0	60

5.3.4. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para *E.canis*.

Dos 60 animais amostrados, 27 foram PCR positivos para *E. canis*, e também soropositivos. Doze animais apresentaram-se soropositivos, porém PCR negativos (Tabela 10).

Tabela 11: Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para *E. canis*.

	Animais soropositivos para <i>E.</i> <i>canis</i>	Animais soronegativos para <i>E.canis</i>	Total
Animais positivos na PCR para <i>E.</i> <i>canis</i>	27	0	27
Animais negativos na PCR para <i>E.</i> <i>canis</i>	12	21	33
Total	39	21	60

5.3.5. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para *Babesia sp.*

Dos 49 animais soropositivos 1 foi PCR positivo para *Babesia sp.*, e os 2 animais PCR positivos, 1 foi sororeagente. (Tabela 11).

Tabela 12: Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para *Babesia sp.*

	Animais sororeagentes para <i>Babesia sp.</i>	Animais não-sororeagentes para <i>Babesia sp.</i>	Total
Animais positivos na PCR para <i>B. canis</i>	1	1	2
Animais negativos na PCR para <i>B. canis</i>	48	10	58
Total	49	11	60

5.3.6. Co-positividade e co-negatividade dos cães frente as PCRs para *Leishmania spp* e *E.canis*.

Dos 54 animais PCR positivos para *Leishmania spp*, 23 também foram PCR positivos para *E.canis*. Dois animais mostraram-se PCR negativos para ambos os agentes (Tabela 12).

Tabela 13:Co-positividade e co-negatividade na PCR para *Leishmania sp* e *E.canis*.

	Animais PCRs positivos para <i>E. canis</i>	Animais PCRs negativos para <i>E. canis</i>	Total
Animais PCRs positivos para <i>Leishmania sp</i>	23	31	54
Animais PCRs negativos para <i>Leishmania sp</i>	4	2	6
Total	27	33	60

5.3.7. Co-positividade e co-negatividade dos cães frente às PCR's para o complexo *L.Donovani* e *E.canis*.

Dos 53 animais PCR positivos para o complexo *L.Donovani*, 23 também foram positivos nas PCR's para *Ehrlichia canis*. Dos 7 animais PCR negativos para *L. chagasi*, dois também foram negativos para *E. canis*.(Tabela 13)

Tabela 14:Co-positividade e co-negatividade na PCR para o complexo *L.Donovani* e *E.canis*.

	Animais PCR's positivos para <i>E. canis</i>	Animais PCR's negativos para <i>E.</i> <i>canis</i>	Total
Animais PCR's positivos para c. <i>L.Donovani</i>	22	31	53
Animais PCR's negativos para c. <i>L.Donovani</i>	5	2	7
Total	27	33	60

5.3.8. Co-positividade e co-negatividade dos cães nas PCR's para o complexo *L.Donovani* e *Babesia* sp.

Dos 53 animais PCR positivos para o complexo *L.Donovani*, um mostrou-se positivo também para *Babesia* sp., e dos 7 animais PCR negativos para *L.chagasi*, um mostrou-se positivo para *Babesia* sp.(Tabela 14).

Tabela 15: Co-positividade e co-negatividade nas PCR's do complexo *L.Donovani* e *Babesia* sp.

	Animais PCR's positivos para <i>Babesia</i> sp.	Animais PCR's negativos para <i>Babesia</i> sp.	Total
Animais PCR's positivos para c. <i>L.Donovani</i>	1	52	53
Animais PCR's negativos para c <i>L.Donovani</i> .	1	6	7
Total	2	58	60

5.3.9. Co-positividade e co-negatividade dos cães nas PCRs de *E.canis* e *Babesia* sp.

Dos 60 animais amostrados, um foi positivo para *E.canis* e *Babesia* sp. Trinta e dois animais foram PCR negativos para ambos os agentes citados (Tabela 15).

Tabela 16: Co-positividade e co-negatividade nas PCRs de *E.canis* e *Babesia* sp.

	Animais PCRs positivos para <i>Babesia</i> sp.	Animais PCRs negativos para <i>Babesia</i> sp.	Total
Animais PCRs positivos para <i>E.canis</i>	1	26	27
Animais PCRs negativos para <i>E.canis</i>	1	32	33
Total	2	58	60

5.4. Análise das similaridades de seqüências obtidas pelo BLAST

Os amplímeros dos produtos dos oligonucleotídeos iniciadores (HE3/ECAN) do gene *16S rRNA*, sequenciados das amostras positivas na PCR para *E. canis*, revelaram 98-99% de similaridade entre si, os produtos dos oligonucleotídeos iniciadores (Piro A e Piro B) do gene *18S rRNA*, sequenciados das amostras positivas na PCR para *Babesia* sp revelaram 98-99% de similaridade para *Babesia canis vogeli*. Já os amplímeros dos produtos dos oligonucleotídeos iniciadores (MC1 e MC2) do DNA do cinetoplasto, sequenciados das amostras positivas na PCR para o complexo *L.Donovani* revelaram 98-99% de similaridade para *Leishmania chagasi*. Todos com altos graus de identidade com as sequencias previamente publicadas no GenBank.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados diferentes métodos diagnósticos para verificar a ocorrência dos agentes supracitados em 60 cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande MS. Foram realizados testes sorológicos (RIFI e ELISA) e moleculares (PCR), o DNA foi extraído a partir de tecidos esplênicos. O baço foi escolhido por ser importante sítio de crescimento parasitário e por estar envolvido na resposta imune protetora ou lesiva ao hospedeiro, no curso da infecção (BRADLEY & KIRKLEY, 1977; WILSON et al., 1996; MELBY et al., 2001; NATAMI et al., 2000; TAFURI et al., 2001; KAYE et al., 2004).

As características das técnicas diagnósticas são parâmetros importantes na escolha do teste a ser utilizado num programa de controle da LVC, principalmente quando a eliminação do cão positivo é uma das medidas adotadas (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Os testes RIFI e ELISA são geralmente utilizados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães, porém observa-se ocorrência de reações cruzadas nesses testes (COUTINHO et al., 1985; VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; OLIVEIRA et al., 2008). No presente trabalho, os testes foram realizados utilizando o protocolo de RIFI descrito por OLIVEIRA et al. (2008) e ELISA utilizando a técnica preconizada por MACHADO et al. (1997) e adaptado por OLIVEIRA et al. (2008). Foi observado 100% de concordância entre a RIFI e o ELISA diferentemente do que foi observado por ASSIS et al. (2010) utilizando os mesmos protocolos de RIFI e ELISA em cães oligossintomáticos em que objetivou-se comparar os métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral, entretanto no mesmo estudo não foi observado discondância entre os testes em cães assintomáticos e polissintomáticos. CUNHA et al. (2012) observaram concordâncias entre os resultados de RIFI e ELISA em cães assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, CAMARGO et al. (2010) também observaram quase 100% de concordância entre os testes, ambos os autores utilizaram diferentes protocolos. Esta divergência de resultados sorológicos presentes na literatura possivelmente, ocorreram em consequência dos diferentes protocolos utilizados (METTLER et al., 2005; ROSÁRIO et al., 2005).

Dos 60 animais amostrados 90% (53) foram PCRs positivos para *L.chagasi* e 100% (60) soropositivos tanto pelo RIFI quanto pelo ELISA teste, revelando maior sensibilidade dos testes sorológicos em relação ao PCR no presente estudo. O melhor desempenho dos testes serológicos para o diagnóstico da LVC pode ser explicado pela alta estimulação policlonal dos linfócitos B provocada pela leishmaniose, o que leva a hipergamaglobulinemia e a produção extensiva de anticorpos que facilitam o diagnóstico por estes ensaios (FEITOSA et al., 2000). Os resultados do presente estudo foram divergentes com os encontrados na literatura. ASSIS et al. (2010) detectaram DNA do parasita nos tecidos (baço, linfonodo e fígado) em 100% dos cães soronegativos e em 89,0% dos suspeitos, elevando para 97% a positividade contra 65% no ELISA e 56% na RIFI demonstrando que a PCR foi o método mais sensível e preciso para o diagnóstico da LVC. MANNA et al., (2004) e GOMES et al, (2007) e também demonstraram que a PCR foi altamente sensível para o diagnóstico clínico da LVC em cães por ser capaz de amplificar o kDNA de *Leishmania* sp. a partir de poucos exemplares de amastigotas presentes em amostras de tecido, porém o método PCR deve ser analisado com cautela nas campanhas epidemiológicas, pois detecta apenas o DNA do parasita no sangue e tecidos dos cães e não necessariamente a doença no animal, diferentemente do exame parasitológico que detecta o parasita intacto nos tecidos (ASSIS et al.,2010).

Embora os testes sorológicos sejam recomendados pelo Ministério da Saúde no inquérito epidemiológico canino (BRASIL, 2006), podem apresentar reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996, SAVANI et al., 2005, LUCIANO et al., 2009). Já foi relatada na literatura a ocorrência de *T. cruzi* e *L.braziliensis* no estado do Mato Grosso dos Sul (NUNES et al., 1995, BORGES-PEREIRA et al., 2001, POMPILIO et al., 2005, SOUZA et al., 2009, SAVANI et al., 2009, JUNIOR et al., 2009 e CORVALAN et al., 2011). No presente estudo assim como o estudo conduzido por CUNHA et al. (2012) em cães do CCZ também de Campo Grande MS, mostraram que a RIFI foi mais sensível em comparação com a PCR, permitindo inferir a partir destes resultados que possa ter ocorrido reações cruzadas nos testes sorológicos pelo fato do local onde foi coletada as amostras ser endêmico para todos os agentes supracitados (BORGES-PEREIRA et al., 2001; JUNIOR et al., 2009; POMPILIO et al., 2005; SOUZA et al., 2009; CORVALAN et al., 2011). O que também explicaria as divergências entre os resultados obtidos com os presentes na literatura são que

protocolos de PCR utilizados pelos pesquisadores demonstraram maior sensibilidade que o seguido no presente estudo.

Dos 54 animais positivos para o gênero *Leishmania*, 53 (90%) foram positivos para o complexo *Donovani*, as amostras positivas foram sequenciadas e blastadas revelando 98-99% de similaridade para *Leishmania chagasi* com alto grau de identidade com as sequências previamente publicadas no GenBank. Um animal foi negativo no PCR para o complexo *Donovani*, podendo ele estar infectado com a forma tegumentar da doença, em que se têm o envolvimento de outras espécies de *Leishmania*, possivelmente a *L. braziliensis* ou a *L. amazonensis* que são espécies em que já se foi relatada a ocorrência em animais e em humanos na literatura no estado do Mato Grosso do Sul. (DORVAL et al., 2002; SOUZA et al., 2005; SAVANI et al., 2009, JUNIOR et al., 2009 e CORVALAN et al., 2011).

A ocorrência de *E. canis* encontrada neste estudo foi de 65% estando acima das relatadas por outros autores no Brasil: AGUIAR et al. (2007), no município localizado no Estado de Rondônia (37,9%), 23% no Paraná (TRAPP et al., 2006), 36% na Bahia (CARLOS et al., 2007), 60% em Cuiabá (ALMEIDA E SOUSA, 2006) e de 42,5% também em Cuiabá (SILVA et al., 2010). Os resultados encontrados no Brasil apresentam valores de prevalência similares aos de outros países que estão entre as zonas tropical e subtropical, concordando com a afirmação de KEEFE et al. (1982), de que cães situados nessa zona climática apresentam maiores freqüências de infecção por *E. canis*.

A Reação de Imunofluorescência Indireta é considerada o teste padrão sorológico, embora a leitura dos resultados seja subjetiva e reações cruzadas entre as várias espécies de *Ehrlichia* (BÉLANGER et al., 2002), já foi demonstrada reatividade cruzada com *N. risticii*, *A. platys*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, entre outras (NEER et al., 2002), como também as coinfeções com múltiplos agentes erliquiais (WANER et al., 2001), que somados, estes dois aspectos, podem levar a falsos positivos ou falsos negativos (VARGAS HERNÁNDEZ, 2010). OLIVEIRA et al. (2008) não acreditam que haja reações cruzadas entre *E. canis*, *B. canis* e *Leishmania* sp. depois que vários soros foram testados pela RIFI e ELISA. Os mesmos pesquisadores concluíram que não se tratam de reações cruzadas entre esses agentes e sim a presença de co-infecção, principalmente em cães de regiões endêmicas.

A fim de diminuir a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, foi utilizado o ponto de corte de 64 (ANDRÉ et al.,2010), maior que os utilizados pela maioria dos autores (HARRUS et al., 1996, MCBRIDE et al. 2001, AGUIAR et al. 2007, NAKAGHI et al., 2008, SILVA et al.,2010, VARGAS-HERNÁNDEZ et al., 2012). Dos 60 animais amostrados 39 (65%) apresentaram anticorpos anti-*E. canis*, com títulos variando de 1: 64 a 1: 2048., porém não podemos descartar a possibilidade de reações cruzadas na sorologia com outras espécies erliquiais, fazendo-se assim que estudos adicionais são necessários para determinar se existem outros agentes da família Anaplasmatacae parasitando os cães de Campo Grande MS.

Muitos autores já descreveram sensibilidade e especificidade superior da nPCR, em diagnosticar erliquiose quando comparado a sorologia (IQBAL et al, 1994;. WEN et al, 1997), dado que esta última técnica diagnóstica não pode distinguir a infecção ativa da exposição ao agente. Além disso, as reações cruzadas observadas nos testes sorológicos são pouco comuns na nPCR (IQBAL et al., 1994; NAKAGHI et al., 2008). Foi detectado no presente estudo DNA erliquial em 27 animais (45%), pelo nPCR, superior ao encontrado por DAGNONE et al.,(2009) em cães do mesmo município (18,2%) utilizando a nPCR. Trinta por cento dos cães soropositivos foram negativos no nPCR, sugerindo que estes animais poderiam estar na fase sub-clínica da doença ou foram previamente expostos a *E. canis*.

Entre as amostras coletadas no CCZ de CG/MS, 49 (81,6%) mostraram-se sororeagentes frente ao antígeno de *B. canis*, com títulos de anticorpos variando de 1:40 a 1:5120. Esse é o primeiro relato da sororeatividade de cães de Campo Grande MS frente ao antígeno de *B. canis*, evidenciando dessa forma, exposição desses animais ao agente da babesiose canina e alta prevalência dessa hemoparasitose na população de cães estudados. A soroprevalência encontrada no presente estudo foi maior do que a encontrada em Belo Horizonte (66,9%) por RIBEIRO et al.,1990, 42,4% em São Paulo (DELL'PORTO et al. 1993) 35,7% no Paraná (TRAPP et al., 2006) e 28,7% em áreas rurais do estado de MG (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). As diferenças de soroprevalência ocorrerem possivelmente devido à região geográfica e a incidência do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*, além da resposta individual a hemoparasitas e as diferentes metodologias utilizadas para diagnosticar a babesiose canina (FURUTA et al., 2009).

Os testes sorológicos são úteis para identificar cães assintomáticos hospedeiros e infecções crônicas, em que o nível de parasitemia pode ser baixo e não detectável em esfregaços de sangue periférico. É importante resaltar, que mesmo depois do tratamento os cães podem permanecer soropositivos por longos períodos, por isso o valor diagnóstico dos testes sorológicos é pobre na ausência de sinais clínicos. A RIFI e o ELISA são considerados altamente sensíveis e pouco específicos devido também a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas entre a *Babesia* sp. com outros parasitas membros da ordem apicomplexa como a *Babesia gibsoni* e a *Rangelia vitalii* e também a possibilidade de ocorrência de falsos negativos em animais muito jovens (BOBADE et al., 1989; DELL'PORTO et al, 1993; YAMANE et al, 1993; BIRKENHEUER et al., 1999; BIRKENHEUER et al., 2003; BOOZER et al., 2003; FURUTA et al, 2004; DANTAS-TORRES et al., 2006; IRWIN, 2009; VARGAS HERNÁNDEZ, 2010). Observando os resultados de sorologia deste estudo, não se pode deixar de questionar a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas, pois apesar da *Babesia canis vogeli* ser comprovadamente a principal espécie causadora de babesiose nos cães do Brasil (PASSOS et al. 2005), TRAPP et al.,(2006) caracterizou molecularmente a presença de *B.gibsoni* (genotipo Asia) em quatro cães do sul do Brasil, confirmando epidemiologicamente e laboratorialmente a evidência de ocorrência de *B.gibsoni* no país. Estudos adicionais devem ser conduzidos para verificar se há a circulação dessa espécie de babesiose entre os cães do município.

A maior soroprevalência de *B. canis* em relação à de *E. canis* pode ser explicada pelo fato de que a presença de animais infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos já que não ocorre transmissão vertical nos artrópodes (NEER, 1998). *Babesia canis vogeli*, entretanto, pode ser transmitida por via transovariana e ser passada para a próxima geração de carrapatos na ausência de animais infectados (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003; ANDRÉ, 2008).

Apenas 2 animais (3,3%) foram PCRs positivos para *Babesia* sp contrastando com os resultados da sorologia em que 81,6% (49) cães apresentaram anticorpos anti-*B.canis*. Apenas um animal PCR positivo foi sororeagente frente ao antígeno de *B.canis*, com baixa titulação (1:40). A PCR, embora seja uma técnica bastante sensível e específica, nos casos de babesiose ela é considerada de baixa sensibilidade em cães infectados naturalmente, assintomáticos ou na fase crônica

da doença (BOOZER et al., 2003; VARGAS-HERNÁNDEZ et al., 2012). Sugere-se que isto decorra da parasitemia que pode ser baixa ou flutuante. Devido a estes inconvenientes deve-se repetir o teste em outras ocasiões. (IRWIN, 2009). VARGAS-HERNÁNDEZ et al., (2012) conseguiram detectar DNA de *Babesia canis* em apenas 5,49% dos cães enquanto que 51,64% foram soropositivos, os autores inferiram estar frente a uma situação em que aqueles animais sorologicamente positivos a *Babesia canis*, poderiam estar cursando a fase crônica ou subclínica da doença, e aqueles PCR positivos estarem apresentando um pico de parasitemia capaz de ser detectado pela técnica. Os resultados mostraram que pode ter acontecido a mesma situação com os animais do presente estudo, por ter ocorrido uma significativa discordância entre os resultados de PCR e sorologia.

Em medicina veterinária, o clínico é muitas vezes confrontado com casos sugestivos de certas doenças caninas, embora os testes de diagnóstico possam indicar resultados contraditórios (FRANCINO et al., 2006). Nossos resultados demonstram que nenhum teste é considerado 100% específico e sensível em detectar os 3 agentes infecciosos supracitados, quando usado sozinho, sendo considerado relevante em alguns casos a combinação de técnicas para se fechar o diagnóstico.

O presente estudo confirmou a ocorrência das espécies de *Ehrlichia*, *Babesia*. e *Leishmania* através da caracterização por métodos moleculares em cães naturalmente infectados na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Nos estudos de caracterização foi observada elevada homologia genética entre a *E.canis*, *B. canis* e *L.chagasi* obtidas, com as já seqüenciadas e depositadas no GenBank, a análise dos genes 16S RNA, 18S RNA e do DNA do cinetoplasto (*E. canis*, *B. canis* e *L.chagasi*, respectivamente) são intimamente relacionadas com a *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* e *Leishmania chagasi* identificadas mundialmente.

Nos últimos anos a ocorrência de doenças transmitidas por ixodídeos tem aumentado, assim como sua expansão em áreas urbanas. Existe uma complexa interação entre os hospedeiros, vetores artrópodes e agentes patógenos. Um exemplo evidente é a inadequada resposta do hospedeiro frente á picada do carrapato. Componentes da saliva do carrapato produzem marcada supressão imune no hospedeiro, principalmente da resposta celular, permitindo não só o estabelecimento da infestação dos ectoparasitos, como também a disseminação e

desenvolvimento de patógenos transmitidos pela fixação do carrapato (SINGH & GIRSCHICK, 2003; VARGAS HERNÁNDEZ, 2010).

Casos de co-infecção por *E. canis* e *B. canis* são freqüentemente encontrados devido ao vetor *Rhipicephalus sanguineus* ser comum entre os cães brasileiros (TROY e FORRESTER, 1990; TABOADA, 1998; OYAFUSO et al, 2002;. DAGNONE et al., 2003; DAGNONE, 2006; NAKAGHI et al, 2008;. OLIVEIRA et al, 2008). A epidemiologia da leishmaniose e de muitos hemoparasitos também se sobrepõem em muitas áreas do mundo, pois a atividade vetorial assim como os períodos de transmissão desses patógenos é semelhante (MEKUZAS et al., 2009). No presente estudo foi encontrado maior número de animais co-infectados por *L.chagasi* e *B.canis* e *L.chagasi* e *E.canis* respectivamente do que animais co-infectados para *E.canis* e *B.canis*.

Ainda que o principal vetor da LVC seja o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, um trabalho francês demonstrou a capacidade do *R.sanguineus* ser infectado por *Leishmania* sp na transmissão transtadial, assim como transmitir a infecção por inóculo de macerado para o roedor *Citellus citellus* (BLANC et al.,1930). No Brasil, foi demonstrada positividade de 15,4% para *L.chagasi* pela PCR, em carrapatos removidos de cães soropositivos para *L.chagasi*. A infectividade de *L.chagasi* encontrada nos carrapatos foi comprovada por meio de inoculação experimental de macerados de carrapatos positivos em hamsters pela via oral e peritoneal, atingindo taxas de infectividade de 58,8% por PCR de fragmentos de baço e fígado, demonstrando assim pela primeira vez, a transmissão de *L.chagasi* pela ingestão de carrapatos infectados (COUTINHO et al.,2005). Segundo PAZ et al.,(2010), os cães infestados por carrapatos tem 53% mais chance de adquirirem infecção por *L.chagasi* em comparação aos cães sem infestação. O que seria esperado visto que as infestações por carrapatos causam anemia, debilidade e aumenta a ocorrência de co-infecção. Um dado também importante são os frequentes relatos dos agentes de controle de endemias e da população de áreas endêmicas acerca da intensa infestação por carrapatos nos cães, principalmente nos que são submetidos à eutanásia nos CCZs, devido à sorologia positiva para *L.chagasi* (CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 2012). Assim a hipótese defendida por alguns autores de que o *R.sanguineus* funciona com vetor mecânico da LVC, vai de encontro aos conhecimentos da parasitologia clássica. Entretanto, os carrapatos ixodídeos, através da hematofagia, podem estar facilitando a transmissão de

hematozoários, inclusive leishmanias, colaborando assim para à alta ocorrência de co-infecções por *E.canis*, *B.canis* e *L.chagasi* em áreas endêmicas

O fenômeno da co-infecção é pouco estudada pelos pesquisadores. A maioria dos trabalhos relacionados com hemoparasitas avalia experimentalmente a infecção frente a um agente. Aqueles relacionados à presença de múltiplos microrganismos infecciosos acometendo o cão, são na forma de relatos clínicos (HARIKRISHNAN, et al., 2005; GAL, et al.,2007; SASANELLI et al., 2009), evidenciando as dificuldades no diagnóstico, severidade das alterações clínicas, tratamento não eficaz e prognóstico ruim (VARGAS HERNÁNDEZ, 2010). Neste trabalho ficou evidente a co-infecção entre *L.chagasi*, *B.canis*, *E.canis* e *L.chagasi* e *E.canis* e *B.canis*.

Em se tratando de co-infecções é importante ressaltar a conjectura de que um patógeno possa funcionar como agente facilitador para o estabelecimento de outras infecções. BOOZER et al.(2003) apontam que a *E.canis* tenha um importante papel como uma fonte de imunossupressão. Infecções experimentais com *Ehrlichia canis* em cães portadores de babesiose e assintomáticos, fizeram com ocorresse a manifestação clínica da doença (VAN HEERDEN et al., 1983; COLLETT et al.,2000). Já FEITOSA et al., (2000) relatam que a imunossupressão causada pela LVC pode promover a ocorrência de co-infecções com outros agentes tais como *Ehrlichia*, *Babesia* e *Dirofilaria* em regiões endêmicas. Em estudo recente MEKUZAS et al.,(2009), colocaram 43 cães soro e PCR negativos para *E.canis* e *Leishmania infantum* em área endêmica para os dois agentes e acompanharam durante 3 anos, os animais foram clínico, sorológico e PCR monitorados periodicamente. Quarenta e dois cães se infectaram por *E.canis* e 35 por *L.infantum*. Dos trinta e cinco animais infectados por *L.infantum* 34 já haviam se infectado por *E.canis* anteriormente. Os sinais clínicos foram mais pronunciados em cães co-infectados do que nos mono-infectados. Os autores concluíram que a erliquiose possa ser um fator contribuidor para o estabelecimento da infecção por leishmaniose.

Este estudo mostrou que cães residentes em Campo Grande/MS, albergam mais de um hemoparasita, podendo trazer como consequência uma exacerbação dos sinais clínicos apresentados. Tendo em vista que a sintomatologia clínica é semelhante nas infecções causadas pelos agentes supracitados, sugere-se que os clínicos veterinários realizem o diagnóstico diferencial para os hemoparasitas sob estudo. Considerando que as co-infecções podem exacerbar uma imunossupressão

os animais co-parasitados estão mais propensos a apresentarem altas parasitemias, o que assegura a transmissão vetorial e a permanência das enzootias.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste experimento, podemos concluir que:

1. Os cães de Campo Grande são expostos aos agentes da leishmaniose visceral, erliquiose e babesiose caninas devido há alta prevalência de anticorpos anti-*E. canis*, anti-*L.chagasi* e anti-*B. canis* na amostra canina estudada nesta pesquisa.
2. Os cães em Campo Grande/MS são encontrados co-infectados por *L. chagasi* e *E. canis*; *L. chagasi* e *B. canis*; *L. chagasi*, *E. canis* e *B. canis*.
3. As reações em cadeia da polimerase (nPCR e PCR), associadas ao seqüenciamento, permitiu confirmar a presença de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis vogeli* e *Leishmania chagasi* nos cães de Campo Grande MS.
4. As sequencias obtidas das amostras deste estudo de *L.chagasi*, *E. canis* e *B.vogeli* apresentam elevada homologia genética à *E.canis*, *B. vogeli* e *L.chagasi*, depositadas no GenBank.

8. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- ALBUQUERQUE, A. L.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 78-84, 2007.
- ALMEIDA, A. J.; PERNI, C. F. R.; MARIANO, F. A. et al. Ocorrência de *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. associada a parâmetros eritrocitários em caninos domiciliados e não domiciliados em Campos- RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. 12., 2002. Rio de Janeiro- RJ. **ANAIS... RIO DE JANEIRO: 2002**, (CD).
- ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F. Análise sorológica e biomolecular da infecção por *Ehrlichia canis*. **Ciência Animal Brasileira**, supl. 1, p. 265-267, 2006.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonary changes in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, n.3, p. 310-315, 2010.
- ANDRÉ, M. R. **Detecção molecular e sorológica de *ehrlichia canis* e *babesia canis* em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro**. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- ANDRÉ, M.R; ADANIA, C.H; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S.M; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K.F AND NAKAGHI, A. C. H. Molecular and Serologic Detection of *Ehrlichia* spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, 46(3), pp. 1017–1023, 2010.

ANDREOTTI R., OLIVEIRA J.M., SILVA E.A., OSHIRO L.M. & MATOS. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Vet. Parasitol.** 135:375-379, 2006.

ARAÚJO, A., JANSEN, A. M., BOUCHET, F., REINHARD, K., FERREIRA, L. F. Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. **Men Inst Oswaldo Cruz.**,v. 98 (suppl.I), p.5-11, 2003.

ASHFORD, D.A., BOZZA, M., FREIRE, M., MIRANDA, J.C., SHERLOCK, I., EULALIO, C., LOPES, U., FERNANDES, O., DEGRAVE, W., BARKER, R.H.Jr. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 251-255. 1995.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.; JUNIOR, A.C.F.N.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A.S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 1, p. 17-25, jan.-mar. 2010.

AZEVEDO, J. **Aspectos comparativos das alterações histopatológicas de cães com diagnóstico presuntivo para leishmaniose visceral canina** [on line]. Disponível na internet: www.kennelvet.com.br/doenca011.htm. Arquivo capturado em 01/04/2007.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v., n., p., 2008.

BÉLANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 9, p. 3506-3508, 2002.

BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I.; GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, SAVARY KC, ET AL. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **J Am Anim Hosp Assoc**, 35:125–8, 1999.

BIRKENHEUER A.J, LEVY M.G, STEBBINS M, POORE M, BREITSCHWERDT E. Serosurvey of anti*Babesia* antibodies in stray dogs and American pit bull terriers and American staffordshire terriers from North Carolina. **J Am Anim Hosp Assoc**. Nov-Dec;39(6):551-7, 2003.

BLANC, G., CAMINOPETROS, J. La transmission du Kala – Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. **C. R. Acad. Sci.** 191, 1162–1164, 1930.

BOBADE PA, ODUYE OO, AGHOMO HO. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, 42:211–7, 1989.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Philadelphia**, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.

BORGES-PEREIRA J., ZAUZA P.L., GALHARDO M.C., NOGUEIRA J.S., PEREIRA G.R.O.L. & CUNHA R.V. Doença de Chagas na população urbana do distrito sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revta Soc. Bras. Med. Trop.** 34:459-466, 2001.

BOURDEAU, P.; GUELFY, J.F. La babesiose canine à *Babesia canis*. **Le Point Vétérinaire, Maison Alfort**, v. 27, n. 168, p. 103-110, 1995.

BRADLEY, D.J., KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 30, p.119-129. 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral: normas e manuais técnicos**. Brasília: Ministério da Saúde. 2003. 120p

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

BREITSCHWERDT, E.B.; ANTHONY, C.G.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; LAPPIN, M.R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S.I.; COWAN, S.M.; CLOOTEN, J.K.; HEGARTY, B.C.; HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.16, n.6, p.642-649, 2002.

BUCK, A. A., ANDERSON, R.I., MACRAE A.A. Epidemiology of poly-parasitism. IV. Combined effects on the state of health. **Tropenmed Parasitol**, v. 29 (3), p. 253-68, 1978.

BUHLES JR., W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 130, n. 4, p. 357-367, 1974.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; PAPANOTTO, T.; LANGRAFE, L.; PAES, P. R. O.; LOPES, R. S. Fase aguda da Ehrlichiose monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. *Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária, pequenos animais*; v.2 (6). p. 82-85, 2004.

BUORO, I. B. J.; KANUI, T. I.; ATWELL, R. B.; NJENGA, K. M.; GATHUMBI, P. K. Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Vol. 31 No. 12 pp. 624-627, 1990.

CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA. **Leishmaniose visceral**, v.65, p.36-41, 2012.

CAMARGO, J.B.; LANGONI, H.; TRONCARELLI, M.Z.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; PADOVANI, C.R. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 414-420, 2010.

CAMARGO-NEVES. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. **Secretaria de saúde. Governo do estado de São Paulo**, p. 122, 2006.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. DE, RODAS, L.A.C., POLETTO, D.W., GOMES, A.C., Feeding habitat of *Lutzomyia longipalpis* in Araçatuba County, State São Paulo, **Brazil. Entomol. Vect.** 9 (Supl1) ISOPS IV: 63, 2002.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CARVALHO, A. A.; MACÊDO, E. L.; VERÇOSA, B. L.; SILVA, S. M. M.; CARVALHO, S. M., COSTA, F. A. L. Caracterização histopatológica e imunoistoquímica da nefropatia da leishmaniose visceral experimental em hamster. **Revista Clínica Veterinária**, v. 71, p. 60-64, 2007.

CARLOS, R. S. et al. Frequência de anticorpos anti-Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi e antígenos de Dirofilaria immitis em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

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

CASTRO, M.B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães, por Ehrlichia canis (DONATIEN & LESTOQARD, 1935) MOSKRESKI 1945**. 1997. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

CHALMERS, S., SCHICK, R.O., JEFFERS, J. Demodicosis in two cats seropositive for Feline Immunodeficiency virus. **J Am Vet Med Ass**, v.194, p. 256-7, 1989

CHIEJINA, S.N, MUSONGONG, G.A, FAKAE, B.B, BEHNKE, J.M, NGONGEH, L.A, WAKELIN D. The modulatory influence of *Trypanosoma brucei* on challenge infection with *Haemonchus contortus* in Nigerian West African Dwarf goats segregated into weak and strong responders to the nematode. **Vet Parasitol.**; v. 128(1-2), p.29-40, 2005.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, May 2003.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n.21, p.539-543, 1997.

CLEVELAND, C.; PETERSON, D.; LATIMER, K. An overview of canine babesiosis. 2004. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/Cleveland>>. Acesso em: 08 fev. 2010.

CODNER E.C, MASLIN W.R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am J Vet Res.** Mar;53(3):294-9, 1992.

COLLETT, M.G. Survey of canine babesiosis in South Africa. **J S Afr Vet Assoc**, v.71, p.180–6, 2000.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, n4, p.863-884, 2003.

CORDERO del C.; ROJO. Babesiosis, Hepatozoonosis, Citauxzoonosis felina. In:___ **Parasitología Veterinaria. Madrid:** McGraw Hill-Interamericana, 2004. p. 672–678.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. – specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 98, p.12-17, 2004.

CORVALAN, F.H.; SAMPAIO, R.N.R.; BRUSTOLONI, Y.M.; ANDREOTTI, R.; LIMA JÚNIOR M.S.C. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 98-102, 2011.

COSTA, J. O.; SILVA, M.; BATISTA Jr, J. A.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA Jr., L.M. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Vet. J.**, v. 174, p. 673-676, 2007.

COSTA-JÚNIOR, L.M; RIBEIRO, M.F.B; REMBECK, K.; RABELO, E.M.L.; ZÄHLER-RINDER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, 86 257–260, 2009.

COUTINHO, S. G. et al. A survey for American Cutaneous and Visceral Leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 17-22, 1985.

COUTINHO, M.T.Z., BUENO, L.L., STERZIK, A., FUJIWARA, R.T., BOTELHO, J.R., DE MARIA, M., GENARO, O., LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** 128, 49–155, 2005.

COX, F. E. G. Concomitant infections. In: Rodent Malaria. ED. KILLICK-KENDRICK, R. & PETERS, W. **London:Academic Press**. p. 309-42., 1978.

COX, F. E. G. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, v.122, p. S23---S38, 2001.

CUNHA A.M, CHAGAS E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi*. **Previous note. Hospital (Rio de Janeiro)**, 11: 3-9, 1937.

CUNHA, R.C.; ANDREOTTI, R.; SILVA, E.A.; PEREIRA, E.; SATO, T.; SOCCOL, V.T. Laboratory diagnosis and clinical signs of canine visceral leishmaniasis in dogs examined at the center for zoonosis control in Campo Grande – MS, Brazil. **Archives of Veterinary Science**., v.17, n.4, p.17-26, 2012.

DAGNONE , A. S.; SOUZA, A. I. DE; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 20-5, 2009.

DAGNONE, A.S. **Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal – SP e de Campo Grande – MS**. 2006. 118 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, Estados Unidos, v. 117, p. 285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(1): 117-118, February 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006.

DÁVILA, A. M., HERRERA, H. M., SCHLEBINGER, T., SOUZA, S. S., TRAUB-CSEKO, Y. M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 3;117 (1-2), p. 1-13, 2003.

DAVOUST, B. et al. Ehrlichiose Canine Experimentale: etude clinique et therapeutique. **Réc Méd Vet.**, Maisson Alfort, v. 167, n.1, p.33-40, 1991.

DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, n.2, p.213-216, Feb.-Apr. 2000.

DELL' PORTO, A., OLIVEIRA, M.R., MIGUEL, O., *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 2, 37-40, 1993.

DESJEUX, P., 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, 27: 305-318.

DE THE G. Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma worldwide; the causal relationship revisited. In: Burkitt's Lymphoma: A Human Cancer Model. Ed. Lenoir, G. M., O'Conor, G. T. & Olweny, C. L. M., pp. 165±176. Lyon: IARC **Scientific Publications** No. 60. 1985.

DORVAL, M.E.C., OSHIRO, E.T., CUPOLLILO, E., CASTRO, A.C.C. Primeiro relato da ocorrência de *Leishmania amazonensis* no Estado de Mato Grosso do Sul. Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35 (III), 220, 2002.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCK, K.C.; LI, P.; WALKER, D.C.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taq-Man Real Time PCR of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v.7, p.504-510, 2005.

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

EPIDEMIOLOG. SERV. SAÚDE, Brasília, 19(1):15-24, jan-mar 2010.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, v. 33, n. 11, p.540-543, 1991.

EWING, S. A. Canine ehrlichiosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** v.13, p.331-353,1969.

FARIA, J.L.M. **Estudo comparativo de detecção de DNA de Ehrlichia canis em sangue total e em aspirado de baço pelo nested PCR em cães naturalmente infectados**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

FARIA, M. B. **Leishmaniose Visceral canina: Revisão bibliográfica**. Rio de Janeiro: UCB. Dissertação (Especialização em clínica cirúrgica e médica). 45p, 2007.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, L.F. O fenômeno parasitismo. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, p. 261-277, 1973.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.3-4, p.214-221, 2006.

FURUTA, P.I., MACHADO, R.Z., OLIVEIRA, T.M.F.S., ROCHA, A.G., TINUCCI-COSTA, M. Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-teste) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. **Rev. Bras.Parasitol. Vet.** 13 (Suppl. 1), 231., 2004.

FURUTA, P. I.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, M.; ROCHA, A.; MACHADO, R.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**; Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 41-45, 2009

GAL, A.; HARRUS, S.; ARCOH, I.; LAVY, E.; AIZENBERG, I.; MEKUZAS-YISASCHAR, Y.; BANETH, G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. **Canadian Veterinary Journal, Ottawa**, v. 48, n. 6, p. 619–622, 2007.

GIUNCHETTI, R. C., O. A. MARTINS-FILHO, et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.121, n.1-2, , p.23-33. Jan 2008.

GIUNCHETTI, R. C., W. MAYRINK, et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with

parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v.84, n.2, , p.269-77. Apr 2008.

GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R. et al. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, n.3-4, p.234-241, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOULD, D.J; MURPHY, K., RUDORF, H., CRISPIN, S.M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. **J Small Anim Pract**, v.41(6), p.263-5, 2000.

GRAMICIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Veterinary Parasitology**, v.35, n.11-12, p.1169-1180, 2005.

GRAHAM, A. L., CATTADORI, I. M., LLOYD-SMITH, J. O., FERRARI, M. J. & BJORNSTAD, O. N. Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 284-291, 2007.

GREENE, C. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. In: ____. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd ed. St. Louis: Saunders, p. 203-231, 2006.

GRENFELL, B.T, DOBSON, A, P Ecology of infectious diseases in natural populations. **Cambridge University Press**, 1995.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L. & HUXSOLL, D.L., (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) **Am. J. Vet. Res.** v.36,(7). p.937- 941, 1975.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DEJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HARIKRISHNAN, T.; PAZHANIVEL, N.; CHELLAPPA, J. Concomitant Babesia gibsoni and Ehrlichia canis infection in a dog. **Veterinarski Arhiv, Chennai**, v. 75, n. 6, p. 513-520, 2005.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEN, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v.66 p.241-249, 1996.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 36, p.

431-447, 1997.

HARRUS, S.; WARNER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vectorborne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 11-12, p. 1309-1318, 2006.

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular.** 2005. 134 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HERRERA, H. M., RADEMAKER, V., ABREU, U.G., D'ANDREA, P. S., JANSEN, A. M. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Acta Trop**, v.102 (1), p. 55-62, 2007.

HERRERA, H. M., ABREU, U.G., KEUROGHLIAN, A, FREITAS, T.P., JANSEN, A.M. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. **Parasitol Res**, v.103(3), p. 619-24, 2008.

HIBLER, S.C.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infection in dogs. Part II – Ehrlichiosis an infectious cyclic thrombocytopenia. **Compend. Contin. Educ.**, v.8, p.106-114, 1986.

HILDEBRANDT P.K, HUXSOLL D.L, WALKER J.S, NIMS R.M, TAYLOR R, ANDREWS M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **Am J Vet Res**. Oct;34(10):1309-20, 1973.

HILDEBRANDT P.K, HUXSOLL D.L, NIMS R.M. Experimental ehrlichiosis in young beagles dogs. **Fed Proc.**, Baltimore, v.29, n.2, p.754 (abstract), 1970.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews, Washington**, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-32, 2007.

IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba - SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, v.8, n.47, p.42-48, 2003.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with

other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

IRWIN, P.J. Review. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites & Vectors**, v. 2, suppl. 1, p. 1-9, 2009.

JUNIOR, M.S.C.L.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.G.; MATOS, M.F.C. Identificação de espécies de Leishmania isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(3):303-308, mai-jun, 2009.

KAKOMA, I.; MEHLHORN, H. Babesia of domestic animals. In:_____.KREIER, J.P. **Parasitic protozoa**. 2.ed. San Diego: Academic Press, v. 7, p. 141-216, 1994.

KAVINSKI, L. C. et al. Ocorrência de um caso de ehrlichiose canina em Curitiba-PR. **Rev. Set. Ciênc. Agr.**, v. 10, n. 1-2, p.217-219, 1988.

KAYE, P.M., SVENSSON, M., ATO, M., MAROOF, A., POLLEY, R., STAGER, S., ZUBAIRI, S., ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 239-253. 2004.

KEENAN, C. M., L. D. HENDRICKS, et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Pathology. **Vet Pathol**, v.21, n.1, p.74-79. Jan 1984

KEENAN, C. M., L. D. HENDRICKS, et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. **Vet Pathol**, v.21, n.1, p.80-6. Jan 1984.

KEEFE, T. J.; HOLLAND, C. J.; SALYER, P. E.; RISTIC, M. Distribution of Ehrlichia canis among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 3, p. 236-238, 1982.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian** , v.15, n.7, p. 949-959, 1993.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.35, n.5, p.376-383, Sep.-Oct. 1999.

KUEHN, N.F, GAUNT S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **J Am Vet Med Assoc**;v.186(4)p.355-8, 1985.

KUHLS, K., ALAM, M. Z., CUPOLILLO, E., FERREIRA, G. E. M., MAURICIO, I. L., ODDONE, R., FELICIANGELI, Comparative Microsatellite Typing of New World Leishmania infantum Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **Plos Neglected Tropical Disiases**, 2011.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M. de; BALBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Vet Ther., Trenton**, v. 4, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 30, p. 24-32, 2001.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **J. Clin. Microbiol.** 39:613–617, 2001..

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst Oswaldo Cruz.**, v.100, p.811-827, 2005.

LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A.; DUNNIGAN, B.; RHA, J.; WILLIAMS, C.R.; BREWER, M.; FALL, M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats of North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Lawrence, v. 225, n. 6, p. 893-896, 2004.

LEWIS, G. E. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 32, n. 12, p. 1953-1955, 1977.

LIN, D.S., BOWMAN, D.D. Macrophage functions in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 33, p.69-78, 1992.

LIMA, W. G.; MICHALIK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, p. 43-53, 2004.

LISTE BURILLO, F.; GASCÓN-PÉREZ, F.M.; PALACIO LIESA, J.; ACENA FABIÁN, M.C. Iron status and anemia in canine leishmaniasis. **Revue de Medicine Veterinaire**, v.145, n.3,p.171-176, 1994.

LLOYD, S. Environmental Influences on Host Immunity. In: **Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations**, Grenfell & Dobson, (eds). 1995.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Princeton**, v. 20, n. 4, p. 418-431,1998.

LUCIANO, R.M.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de

imunofluorescência indireta (RIFI). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Fort Dodge. p.28-29, 2006.

MACHADO, R.Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, 71, p. 17-26, 1997.

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

MADEIRA MF, SCHUBACH AO, SCHUBACH TMP, PEREIRA SAP, FIGUEIREDO FB, BAPTISTA C, LEAL CA, MELO CX, CONFORT EM, MARZOCHI MCA. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Parasitology**, 2006.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.125, n.3-4, p.251-262, 2004.

MANUAL DE ZONOSSES. **Programa de zoonoses região sul**, v.1, 2009.

MARQUARDT, W.C.; DEMAREE, R.X.; GRIEVE, R.B. **Parasitology and vector biology**. 2nd. ed. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000. p. 211-224.

MARTINS, J.J.N. (Coord.). **Zoonoses emergentes nas regiões sul e sudeste: vigilância e controle da leishmaniose americana de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto: SUCEN, 46p., 1999.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v.1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 315-322, 2001.

MCKAY, D. M. The beneficial helminth parasite? **Parasitol**, v. 132, p. 1–12, 2006.

MEINKOTH, J.H. et al. Ehrlichiosis in a dog with seizures and non regenerative anemia. **J Am Vet Med Assoc**, v.195, n.12, p.1754-1755, 1989.

MEKUZAS. Y, GRADONI. L, OLIVA. G, FOGLIA MANZILLO. V AND BANETH. G. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. Journal Compilation 2009 **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, CMI, 15 (Suppl. 2), 30–31

MELBY, P.C., TABARES, A., RESTREPO, B.I., CARDONA, A.E., MCGUFF, H.S., TEALE, J.M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control infection. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 15-25, 2001.

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 44 (5):255-259, September-October, 2002.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. Canine leishmaniasis: na update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, p. 46-53, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: 2006, 120 p.

MORAIS, H.A.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N. (2002). Eriquiiose In: **CONGRESSO ESTADUAL DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS DO RIO DE JANEIRO**, v.4., Rio de Janeiro. Resumos, Anclivepa.

MOREIRA, N. D.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; JULIANA VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; MALAQUIAS, L. C. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. AND REIS, A. B. Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, n. 4, p. 418-424, 2008.

MOURA, S. T.; FERNÁNDEZ, C. G. N.; RUFFINO, S. et al. Ocorrência de hemoparasitos em cães de Cuiabá, Estado de Mato Grosso 2002. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 12., 2002. Rio de Janeiro-RJ. **ANAIS...**Rio de Janeiro: 2002, (CD).

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325-339, 1998.

MZEMBE, S.A., LLOYD, S., SOULSBY, E.J. Macrophage mediated resistance to *Babesia microti* in *Nematospiroides dubius* - infected mice. **Z Parasitenkd**, v. 70 (6), p. 753-61, 1984.

NAKAGHI, A.C.H; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI,

C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.766-770, mai-jun, 2008.

NATAMI, A., SAHIBI, H., LASRI, S., BOUDOUMA, M., GUESSOUSS-IDRISSI, N., RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Vet. Res.** 31, 355-363, 2000.

NEER, T.M. Ehrlichiosis: Canine Monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. (Org.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. Philadelphia: **W. b. Saunders.**, p. 139-154, 1998.

NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the infectious Disease Study Group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, p. 309-315, 2002.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection - Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: Greene, C. E. **Infectious Diseases in the dog and cat**. St. Louis: W.B. Saunders Company, p. 203-216, 2006.

NOGUEIRA J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A Importância Da Leishmaniose Visceral Canina Para A Saúde Pública: Uma Zoonose Reemergente **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária** Ano VII, n. 13, p. 12, 2009.

NUNES V.L.B.; DORVAL M.E.C.; OSHIRO E.T.; NOGUCHI R.C, ARÃO L.B, HANS FILHO G, ESPÍNDOLA M.A, CRISTALDO G., ROCHA H.C, SERAFINE L.N, SANTOS D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudos na população humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 28:185-193,1995.

NYINDO, M.B.A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; SMITH, A.R. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent – *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 1, p. 1651-1658, 1971.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; PEREIRA DE SOUZA, J. C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

OLIVEIRA, T. M.; GUIMARÃES, A. M.; Prevalência de anticorpos anti-Babesia canis em Lavras, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** 1 CD-ROM.

OLIVEIRA AG, GALATI EAB, OLIVEIRA O, OLIVEIRA GRO,ESPINDOLA AR, DORVAL MEC, ET AL. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande,

state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** N;101:869-874, 2006.

OLIVEIRA, T.M.; FURUTA, P.I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.15, n.1, p.7-1, 2008.

ORIÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis***. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 157-163, 2009.

OYAFUSO, M. K. et al. Characterization of ticks infecting dogs in a hospital population in North Paraná, Brazil. **Semina- Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 87-90, 2002.

PAHO- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Leishmaniasis: 2007 update. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.htm>>

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZÄHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M.F.B., MAGALHÃES, D. F.; SATHLERD, K. P. B.; MORAISD, M. H. F.; FIÚZAD, V. O.P.; BRANDÃO, S. T.; WERNECKE, G. L.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E. S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case–control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine** v.97, p. 131–133, 2010.

PETNEY, T. N.& ANDREWS, R. H. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 377-393, 1998.

PFAFF, A.W., CANDOLFI, E. Immune responses to protozoan parasites and its relevance to diagnosis in immunocompromised patients. **Europ J Protitol**, v. 39, p. 428-34, 2003.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 501 - 515, 1998.

POMPILIO M.A., DORVAL M.E., CUNHA R.V., BRITTO C. & BORGES-PEREIRA J. Clinical and parasitological aspects of Chagas' disease in Mato Grosso do Sul State. **Revta Soc. Bras. Med. Trop.** 38:473-478, 2005.

QUINNELL, R. J.; COURTNEY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 253-261, 2001.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 3, p. 384-395, 1981.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLOSRIOSOS, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REIS, A. B. TEIXEIRA-CARVALHO, A. Isotypes patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 112, p. 102-116. Feb., 2006.

REMO, G. Canine Babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Yardley**, v.20, n.4, p. 459-466, 1998.

REITHINGER R.; LAMBSON, B. L.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. **J. Clin. Microbiol.** 38:748-751, 2000.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J. Clin. Microbiol.** 40, nº 7, p. 2352-2356, 2002.

RIBEIRO, M.F.B., PASSOS, L.M.F., LIMA, J.D., GUIMARÃES, A.M. Frequency of anti-Babesia canis antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 42, 511-517, 1990.

RIBEIRO, V. M., MICHALICK, M. S. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Nosso clínico**, p. 1-19, 2001.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C.; SIREGAR, A. G.; PASARIBU, F. H.; MALOLE, M.B., (1991). Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. **J. Clin. Microbiol.** v.30, (1), p. 143-148.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 704-709.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANDT, P.K.; NYINDO, M.B.A. Serological diagnosis of canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infection and Immunology*, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1972.

ROSÁRIO, E. Y. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

SALGADO, F.P. **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2006. Tese (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária**, v.2, n.11, p.24 -28, 1997.

SANTANA, C. C., VASSALO, J et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasit Immunol**, v. 30, p. 515-524. Mai, 2008.

SANTARÉM, V. A. Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*. 2003. 127 f. **Tese (Doutorado)**. - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Botucatu, 2003.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. R.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalence of anti-leishmania spp antibodies in dogs from garanhuns, in the middle scrub zone (agreste) of pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SANTOS SO, ARIAS J, RIBEIRO AA, HOFFMANN MP, FREITAS RA, MALACCO MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Ent** 12: 315-317, 1998.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/LVA.pdf

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; LUBAS, G.; OTRANTO, D.; DE CAPRARIIS, D. Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and Hepatozoon species in a dog. **Veterinary Record, London**, v 3; n. 164 p.22-3, 2009

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine Leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**. v. 20, n. 5, p. 471-489, 2009.

SARIDOMICHELAKIS M. N., KOUTINAS A. F et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **J Compil**, 18: 227-233. Apr, 2007.

SAVANI, E.S.M.M.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; CASTILHO, T.M.; ARAUJO, F.S.; ILHA, I.M.N.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; FLOETER-WINTER, L.M. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100(7) p. 739-741, 2005.

SAVANI ESMM, NUNES VLB, GALATI EAB, CASTILHO TM, ZAMPIERI RA, FLOETER-WINTER LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology** 160: 18-24, 2009.

SCHETTERS, TH. P. M.; KLEUSKENS, J.; SCHOLTES, N. et al. Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. *Vet Parasitol*, v.73, p. 35-41, 1997.

Secretaria Estadual de Saúde/MS - Serviço de Operações e Epidemiologia.
Disponível em:
http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id_comp=2704&id_reg=69&voltar=lista&site_reg=116&id_comp_orig=2704

SESAU/MS. Boletim Informativo. Leishmaniose visceral Americana (Calazar). Available from: <http://www.saude.ms.gov.br/Saude/Outros/LeishmanioseVisceralAmericana.htm>. Access: 12 April 2005.

SHIBATA, S. I.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C.; ITO, T. New Ehrlichia species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1331-1338, 2000.

SILVA E.A, ANDREOTTI R, HONER MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40 (4):420-425, 2007.

SILVA, F. S. Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Tropica** – Ciências Agrárias e Biológicas. v.1, n. 1, p. 20, 2007.

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

SILVA, V.C. **Identificação de reservatórios de zoonoses em insetos vetores por espectrometria de massa.** / Vladimir Costa Silva. Brasília: 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília – UnB / Brasília – DF, 2006, 68p.

SILVA, V.LD. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental.** 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA ES, OLIVEIRA AG, CARVALHO FG, SILVA EA, FRIOZI E, FARIAS R. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Resumos do 36º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**; 2000 Feb.20-24; São Luís, MA. Brasília; 2000.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the diagnosis of Leishmaniasis. **J. Postgrad. Med.**, v.49, p.55-60, 2003.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Clinical Microbiology and Infectious Disease of the Dog and Cat.* Philadelphia: **W.B.Saunders Co.**, p.450-458, 1990.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M. Q.; BASU, D.; BRUIJN, M. H. L.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, n. 105, p. 183–192, 1992.

SOLANO-GALLEGO L, FERNANDEZ-BELLON H, et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. **J Comp Pathol**, 130: 7-12, 2004.

SOUZA, A.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; CAMACHO, A.A. Soroprevalência da infecção por Trypanosoma cruzi em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 29(2):150-152, fevereiro 2009.

SOUZA, A.I, BARROS EMS, ISHIKAWA EAI, ILHA IMN, MARIN GRB, NUNES VLB. Feline leishmaniasis due to Leishmania (Leishmania) amazonensis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Vet Parasitol** 128: 41-45, 2005.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER.K.W & KONG,L.I. (1989).: Bacterial, Rickettsial, Protozoal and Miscelalaneous infections. In: Ettinger.S.J.(ed): **Textbook of Veterinary Internal Medicine.** Philadelphia, W,b. Saunders Co, p. 265-297.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat.* 2nd ed., **Philadelphia: W.B. Saunders**, p. 473-481, 1998.

TAFURI, W. L., M. R. DE OLIVEIRA, et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, v.96, n.3, p.203-12. Apr, 2001.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; MORAIS, H. S. A.. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

TRAPP, S.M., MESSICK, J.B., VIDOTTO, O., JOJIMA, F.S., MORAIS, H.S., *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.** 141, 177–180, 2006.

TRAVI B.L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-LERNA, J.; ADLER, G. H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic áreas. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n.1, p. 83 – 86, 2002.

TROY, G.C.; FORRESTER, S.D.. Canine ehrlichiosis. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 404-418.

TROY, G. C.; VULGAMMOTT, J. C.; TURNWALD, G. H. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. **Journal of the American Animal Hospital Association, Lakewood**, v. 16, p. 181-187, 1980.

UILENBERG, G.; FRANSSSEN, F. F.; PERIE, N. M. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Vet Q**, v.11, p.33-40, 1989.

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system: Ehrlichiosis. In: JUBB, K.V.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.C. **Pathology of domestic animals**. San Diego: Academic, 1993. p.195-196.

VAN HEERDEN J, REYERS F, STEWART CG. Treatment and thrombocyte levels in experimentally induced canine ehrlichiosis and canine babesiosis. **Onderstepoort J Vet Res**, v.50, p.267–70, 1983.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANDRÉ, M.R.; FARIA, J.L.M.; MUNHOZ, T.D.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, M.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v.186 p. 254– 260, 2012.

VARGAS HERNÁNDEZ, G. **DETECÇÃO PARASITOLÓGICA, MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES DA REGIÃO CENTRO - ORIENTAL DA COLÔMBIA**. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VIDOTTO, O.; MANDUCCA, S. Babesiose canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIKETSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto, MG. **Anais...**

WADDLE, J.R.; LITTMAN, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.24, p.615-620, 1988.

WALKER J.S, RUNDQUIST J.D, TAYLOR R, WILSON B.L, ANDREWS M.R, BARCK J, HOGGE A.L JR, HUXSOLL D.L, HILDEBRANDT P.K, NIMS .RM. Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. **J Am Vet Med Assoc.** Jul 1;157(1):43-55, 1970.

WANER, T. et al. Canine Monocytic Ehrlichiosis – an overview. **Isr. J. Vet. Med.**, v. 54, n. 4, p. 103-107, 1999.

WANER, C.K.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 95, p. 1-15, 2001.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WILSON, M.E., SANDOR, M., BLUM, A.M., YOUNG, B.M., METWALI, A., ELLIOT, D., LYNCH, R.G., WEINSTOCK, J.V. Local suppression of IFN-g in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, v. 156, p.2231-2239. 1996.

WITT, C.J., MOENCH, T.R., GITTELSON, A.M., BISHOP, B.D., CHILDS, J.E. Epidemiologic observations on feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats in Baltimore, Md. **J Am Vet Med Assoc**, v. 194(2), p. 229-33, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Research on leishmaniasis. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>

WOODY, B.J. & HOSKINS, J.D. (1991). Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinical of North American Small Animal Practice**, v. 21, (1): p.75-97.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research, Berlin**, v. 84, n. 7, p. 544-548, 1998.

ZHANG, J.; POPOV, V.L.; GAO, S.; WALKER, D.H.; YU, X. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 610-618, 2006.

YAMANE, I., THOMFORD, J.W., GARDNER, I.A., DUBEY, J.P., LEVY, M., CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Am. J. Vet. Res.** 54, 1579–1584, 1993.