

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

PREVALÊNCIA E ALTERAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS DE ERLIQUIOSE,
BABESIOSE, ANAPLASMOSE, HEPATOOZONOSE E LEISHMANIA VISCERAL
CANINAS.

CINTHYA BRILLANTE CARDINOT

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2017

Cinthy Brillante Cardinot

PREVALÊNCIA E ALTERAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS DE ERLIQUIOSE,
BABESIOSE, ANAPLASMOSE, HEPATOOZONOSE E LEISHMANIA VISCERAL
CANINAS.

Tese apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Ge-
rais como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirur-
gia Veterinárias

Prof. Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo
de Oliveira Paes

Belo Horizonte

Escola de Veterinária - UFMG

2017

C267p Cardinot, Cinthya Brillante, 1982-
Prevalência e alterações clínico-laboratoriais de erliquiose, babesiose, anaplasnose, hepatozoonose e leishmania visceral caninas / Cinthya Brillante Cardinot. – 2017.
155 p. : il.

Orientador: Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Doenças transmissíveis – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. I. Paes, Paulo Ricardo de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

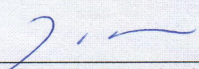
CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

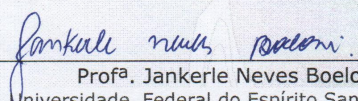
CINTHYA BRILLANTE CARDINOT

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

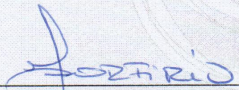
Aprovada em 14 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



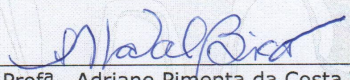
Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Presidente - Orientador



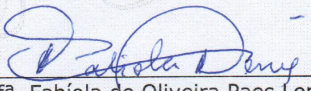
Profª. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES



Prof. Lenir Cardoso Porfirio
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES



Profª. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 - CEP 30123-970
Belo Horizonte - Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



Escola de Veterinária
UFMG

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os animais, em especial, aos cães deste estudo por serem simplesmente puros de coração.

Dedico ainda a um rapaz (do qual não me recordo o nome, infelizmente), que em um dia de visita, olhou para mim e pediu que não fôssemos embora, pois era a primeira vez que alguém “de fora” tinha ido visitar sua região e seu cão. E ainda completou: - Pois se vocês forem embora, acho que não vão voltar e foi tão bom vocês terem vindo! No momento confesso que fiquei sem reação e só disse que infelizmente teríamos que ir. Mas hoje te digo rapaz, que voltarei com certeza e espero que para ajudar mais, muito mais.

Agradecimentos especiais

Quero agradecer a pessoa que mais acreditou em mim nesta longa jornada, por ter me dado à oportunidade de ser sua orientada. Um professor que aceitou me orientar numa das piores fases da minha vida, que me olhou e disse que tudo daria certo no final. Um professor não só no meio acadêmico, mas na vida. Um ser humano que sabe dos seus princípios, que possui suas convicções e não permite que ninguém lhe diga o contrário. Uma pessoa de personalidade e alma cativantes. Um homem de espírito livre que não se deixou moldar pela sociedade, que é verdadeiro consigo mesmo. Um exemplo a ser seguido! Meu muitíssimo obrigada, professor Paulo!!!!

Ao caminharmos pela jornada da vida, nunca sabemos aonde ela vai nos levar. Mas posso dizer que no meu caso fui ao encontro de uma das pessoas de maior coração que já conheci. Uma pessoa que me acolheu, que me ensinou tantas coisas profissionais e pessoais que valem mais que muita riqueza. Professora Lenir nem sei como agradecer e retribuir a altura de tudo que a senhora já me ajudou. Abriu as portas de seu laboratório, de sua casa, de sua vida e de seu coração para mim. Obrigada eternamente.

Caio e Joaquim meu eterno obrigada a vocês dois, por terem aceitado um desafio imenso. Vocês moram no meu coração. E para sempre o que precisarem podem contar comigo!

Agradecimentos

À Deus por sempre me auxiliar e por colocar pessoas maravilhosas ao meu encontro.

Aos animais por serem assim, simplesmente eles!

Aos meus pais por acreditarem em mim e ficarem sempre na torcida.

Ao meu marido Carlos Maurício por ter me ajudado muito na realização deste trabalho, por ser meu companheiro e sempre encontrar-se presente nas horas mais difíceis.

A minha grande amiga Karen, que por mais que estejamos longe, no coração estamos extremamente perto, por sempre me ajudar, por sempre entrar nesta onda doida comigo e por continuar me amando mesmo eu lhe dando tanto trabalho.

Ao professor Paulo pela orientação, por seus conselhos, pela confiança e por ter me apresentado esta linda área que é a patologia clínica. Meu eterno agradecimento.

A professora Júlia por ser minha coorientadora, por abrir as portas do seu laboratório, por me ensinar tanto, por me aconselhar, por me corrigir, por me mostrar como ser forte, determinada e principalmente por seu profissionalismo e exemplo de amor aos animais.

A professora Mary por ser minha coorientadora, por sempre me ajudar, sempre tirar minhas dúvidas e por ser sempre tão bem humorada, pois como ela sabe melhor do que ninguém sou uma pessoa um “pouco” desesperada e só ela é capaz de me fazer rir de mim mesma nestas situações. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Rubens por ser meu coorientador, por me dar sempre conselhos valiosos, por me ouvir, por ser esta pessoa leve, sincera e de coração gigante.

Ao professor Marcus Zanini por abrir as portas do seu laboratório, por seus conselhos, por me ajudar com as sorologias da *Leishmania infantum chagasi*.

A professora Adriana Madureira por me auxiliar nas estatísticas e nas sorologias da *Leishmania infantum chagasi*.

A professora Adriana Madeira por abrir as portas do seu laboratório permitindo que eu pudesse realizar as extrações de DNA, e por ter me apresentado o mestrando Joaquim.

A professora Lenir por ter aberto as portas de seu laboratório, por seus conselhos, por todo auxílio na realização do estudo.

Ao professor Rodrigo Horta por me auxiliar nas estatísticas e correções dos trabalhos.

As Profas Adriane, Fabíola, Jankerle e Lenir por aceitarem tão gentilmente compôr a banca de doutorado, meu eterno agradecimento!

Ao Caio por ter embarcado nesta aventura, por ter me ajudado imensamente nas coletas e processamento das amostras durante tantos dias, noites e madrugadas. Por mais que estivéssemos exaustos para continuar era sempre muito agradável trabalhar com você, pois seu espírito leve e extrovertido deixava tudo mais fácil. Minha eterna gratidão.

Ao Joaquim por me ajudar na extração de DNA e realização das PCRs, por ter topado um desafio imenso, por todas as madrugadas de laboratório, por ter me ensinado a gostar um pouquinho da “bancada”, por ter me ensinado tanto sobre biologia e DNA. Por ser uma pessoa de paz e equilíbrio no meio do meu turbilhonamento. Meu imenso obrigada!

Ao técnico de laboratório Ronaldo por ter me ensinado a usar todos os equipamentos do laboratório de patologia clínica e por ter me auxiliado nas visitas.

Ao Allan, Mariana, Flávia, Rudson e Kamilla por terem me auxiliado nas coletas e visitas.

Ao Yuri e Silas pelo auxílio com os ELISA.

Aos tutores dos cães participantes do estudo.

A Universidade Federal de Minas Gerais por permitir que eu fizesse parte desta casa.

A Universidade Federal do Espírito Santo por ter me acolhido e por ter sido o local da realização do estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado nos dois primeiros anos da realização deste estudo.

Me descobri neste estudo!

Meu coração e minha alma são verdadeira e apaixonadamente extensionistas!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. <i>ANAPLASMA PLATYS</i>	21
2.1.1. Achados clínicos e laboratoriais.....	22
2.1.2. Tratamento.....	23
2.1.3. Diagnóstico.....	23
2.2. <i>BABESIA SP.</i>	24
2.2.1. Sinais clínicos e laboratoriais:.....	27
2.2.2. Diagnóstico.....	27
2.2.3. Tratamento.....	29
2.2.4. Prevenção.....	30
2.3. <i>EHRlichia canis</i>	31
2.3.1. Alterações clínicas.....	31
2.3.2. Alterações laboratoriais.....	33
2.3.3. Prevalência da doença.....	34
2.3.4. Potencial zoonótico.....	35
2.3.5. Diagnóstico laboratorial.....	35
2.3.6. Tratamento.....	37
2.3.7. Prevenção.....	37
2.4. <i>HEPATOZOON CANIS</i>	38
2.4.1. Epidemiologia.....	39
2.4.2. Alterações clínicas e laboratoriais.....	39
2.4.3. Diagnóstico laboratorial.....	40
2.4.4. Tratamento.....	41
2.4.5. Prevenção.....	41
2.5. <i>LEISHMANIA SP.</i>	41
2.5.1. Epidemiologia.....	44
2.5.2. Classificação da Leishmaniose canina.....	44
2.5.3. Alterações laboratoriais.....	45
2.5.4. Diagnóstico laboratorial.....	47
2.5.5. Prevenção.....	48
2.6. LESÕES RENAIIS EM DECORRÊNCIA DE INFECÇÕES TRANSMITIDAS POR VE- TORES.....	49
2.7. SÍNDROME DO EUTIREOIDEO DOENTE EM CÃES COM HEMOPARASITOSE.....	52
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	54
3.2. TRATAMENTO.....	58
3.3. 1.1. AVALIAÇÃO FÍSICA DOS CÃES.....	58
3.4. 1.2. AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA - FATORES DE RISCO.....	58
3.5. COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	60
3.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	60
3.6.1. Esfregaço sanguíneo, capa leucocitária e hemograma.....	60
3.6.2. Bioquímicos séricos.....	62

3.6.3. Fibrinogênio.....	62
3.6.4. Hormônios Tireoidianos.....	62
3.6.5. Urinálise.....	62
3.6.6. Bioquímicos urinários.....	63
3.7. ANÁLISES MOLECULARES.....	63
3.7.1. Extração e pureza de DNA.....	63
3.7.2. Amplificação de DNA.....	64
3.7.3. Sequenciamento nucleotídico dos hemoparasitos.....	66
3.8. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO- ELISA.....	67
3.8.1. Obtenção da fração solúvel de antígenos.....	67
3.8.2. Execução do ensaio imunoenzimático - técnica de ELISA indireta.....	68
3.9. TESTE RÁPIDO DE IMUNOENSAIO POR IMUNOCROMATOGRAFIA.....	68
3.10. ESTATÍSTICA.....	68
4. ARTIGO 1 - ASSOCIAÇÃO DE HEMOPARASIToses COM RISCOS EPIDEMIO- LÓGICOS PARA CÃES PROVENIENTES DE ÁREAS RURAIS E URBANAS NO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.....	69
4.1. RESUMO.....	69
4.2. ABSTRACT.....	69
4.3. INTRODUÇÃO.....	69
4.4. METODOLOGIA.....	70
4.4.1. Animais.....	70
4.4.2. Avaliação epidemiológica – Fatores de Risco.....	71
4.4.3. Coleta das amostras biológicas.....	71
4.4.4. Análises moleculares.....	71
4.4.5. Estatística.....	71
4.5. RESULTADOS.....	72
4.6. DISCUSSÃO.....	73
4.7. CONCLUSÃO.....	75
4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
5. ARTIGO 2 - DETECÇÃO DE REAÇÃO CRUZADA COM <i>BABESIA CANIS VOGELI</i>, <i>EHRlichia CANIS</i>, <i>ANAPLASMA SP.</i> E <i>HEPATOZOON CANIS</i> EM TESTE ELISA PARA <i>LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI</i> EM CÃES DE ÁREA NÃO ENDÊMICA..	79
5.1. RESUMO.....	79
5.2. ABSTRACT.....	79
5.3. INTRODUÇÃO.....	80
5.4. METODOLOGIA.....	80
5.5. RESULTADOS.....	82
5.6. DISCUSSÃO.....	82
5.7. CONCLUSÕES.....	84
5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
6. ARTIGO 3 - HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES HEMOPARASI- TADOS ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM DOXICICLINA NO MUNICÍPIO DE ALEGRE – ES.....	87
6.1. RESUMO.....	87
6.2. ABSTRACT.....	87
6.3. INTRODUÇÃO.....	87
6.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	88

6.4.1. Seleção dos animais.....	88
6.4.2. Obtenção de amostra.....	88
6.4.3. Análises moleculares.....	89
6.4.4. Formação dos grupos.....	89
6.4.5. Tratamento.....	89
6.4.6. Análise estatística.....	90
6.5. RESULTADOS.....	90
6.6. DISCUSSÃO.....	94
6.7. CONCLUSÃO.....	96
6.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
7. ARTIGO 4 - BIOMARCADORES RENAI S EM CÃES INFECTADOS COM DIFE- RENTES HEMOPARASITOS.....	100
7.1. RESUMO.....	100
7.2. ABSTRACT.....	100
7.3. INTRODUÇÃO.....	101
7.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	101
7.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
7.6. CONCLUSÃO.....	108
7.7. REFERÊNCIAS.....	109
8. ARTIGO 5 - HORMÔNIOS TIREOIDIANOS DE CÃES COM <i>EHRlichia canis</i> MONO OU COINFECTADOS TRATADOS COM DOXICICLINA.....	112
8.1. RESUMO.....	112
8.2. ABSTRACT.....	112
8.3. INTRODUÇÃO.....	112
8.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	113
8.4.1. Cães.....	113
8.4.2. Hormônios tireoidianos.....	114
8.4.3. Análises moleculares.....	114
8.4.4. Tratamento.....	114
8.5. RESULTADOS.....	115
8.6. DISCUSSÃO.....	117
8.7. CONCLUSÕES.....	119
8.8. REFERÊNCIAS.....	119
9. REFERÊNCIAS.....	122
10. APÊNDICES.....	152
10.1. APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	152
10.2. APÊNDICE 2 – FICHA DE AVALIAÇÃO FÍSICA.....	153
10.3. APÊNDICE 3 – FICHA DE FATORES DE RISCO EPIDEMIOLÓGICO.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição em porcentagem de cães hemoparasitados no Município de Alegre pertencentes as áreas rural e urbana.....	72
Tabela 2: Animais apresentando reação cruzada no teste ELISA para leishmaniose visceral canina, correlacionado com infecções por diferentes hemoparasitos testados.....	82
Tabela 3: Média e desvio-padrão dos valores hematológicos dos cães pertencentes aos grupos monoinfectados (G1), coinfectados (G2) e controle (G3), antes (D1) e depois do tratamento (D2).....	92
Tabela 4: Média e desvio-padrão dos valores bioquímicos dos cães pertencentes aos grupos monoinfectados (G1), coinfectados (G2) e controle (G3).....	93
Tabela 5: Valores mínimos e máximos, com média e desvio padrão (DP), da relação proteína/creatinina urinária (UPC), atividade urinária da gama glutamil transferase (gGTU), relação atividade urinária da glutamiltransferase/creatinina urinária (gGTU/CrU), atividade urinária da fosfatase alcalina (FAU), creatinina sérica (Cr soro), densidade urinária (Densidade) dos grupos, dos cães doentes não hemoparasitados (G1), cães monoinfectados (G2), cães coinfectados (G3) e cães saudáveis do grupo controle (G4), antes e depois do tratamento.....	106
Tabela 6: Valores individuais dos hormônios tireoidianos antes e após tratamento com doxiciclina de cães PCR positivos para hemoparasitoses.....	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência de iniciadores utilizados para identificação dos gêneros de hemoparasitos.	65
Quadro 2: Condição para reação de nPCR para Babesia /Hepatozoon, Ehrlichia monocítica e granulocítica ou plaquetária. Utilizando os primers RIB19/20, NS16SCH1F/ NS16SCH1R, GE3a/GE10r para 1a reação e BAB-rumF/BAB-rumR, NS16SCH2F/ NS16SCH2R e GE9f/GE2 para 2a reação respectivamente.....	66
Quadro 3: Programa submetido ao termociclador para realização da Babesia /Hepatozoon, Ehrlichia monocítica e granulocítica ou plaquetária. Utilizando os primers RIB19/20, NS16SCH1F/ NS16SCH1R, GE3a/GE10r para 1a reação e BAB-rumF/BAB-rumR, NS16SCH2F/ NS16SCH2R e GE9f/GE2 para 2a reação.....	66
Quadro 4: Sequência de iniciadores utilizados para identificação de gêneros de hemoparasitos pela técnica de nested PCR (nPCR).....	81
Quadro 5: Perfil infeccioso de cada animal dos grupos monoinfectados (G1) e coinfectados (G2) antes e depois do tratamento.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cães participantes do projeto apresentando sinais clínicos de infecções transmitidas por vetores.....	55
Figura 2: Mapa do município de Alegre-ES abrangendo os sete distritos e a sede participantes do estudo.....	57
Figura 3: Amostra de locais e animais das áreas rurais e urbanas visitados para a realização do estudo.....	59
Figura 4: Observação de hemoparasitos presentes em sangue de cães naturalmente infectados.....	61
Figura 5: Alterações clínicas observadas nos cães doentes não hemoparasitados (G1), cães monoinfectados (G2) e cães coinfectados (G3).....	104

RESUMO

Foram realizados cinco estudos distintos. O estudo 1 objetivou determinar através da detecção pela técnica da nested PCR a prevalência de *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, em cães naturalmente infectados em áreas rural e urbana do Município de Alegre, Sul do Espírito Santo e verificar a presença de fatores de riscos associados a estas infecções. O estudo 2 objetivou evidenciar a existência de leishmaniose visceral canina, utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimático – ELISA e teste rápido imunocromatográfico, bem como verificar a ocorrência de possíveis reações cruzadas ou coinfeções com diferentes hemoparasitos presentes na mesma região. O estudo 3 avaliou as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas de cães com diferentes hemoparasitoses e realizou comparações entre os diferentes perfis infecciosos e a influência do tratamento com doxiciclina. O estudo 4 avaliou as alterações renais de cães infectados com diferentes hemoparasitos por meio de biomarcadores renais antes e após tratamento com doxiciclina. O estudo 5 avaliou a presença das alterações hormonais tireoidianas em cães infectados com *Ehrlichia canis* e coinfectados com *Anaplasma platys* e/ou *Babesia canis vogeli*, antes e depois do tratamento com cloridrato de doxiciclina. No estudo 1 comprovou-se pela primeira vez a existência de *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis*, na região do sul do Espírito Santo e de *Ehrlichia canis* em área rural da mesma região, e que os fatores de risco avaliados foram significativos em cães com hepatozoonose, mas não puderam ser associados a *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Ehrlichia canis* pelo reduzido número de cães positivos e concluiu-se que a cidade de Alegre é uma área endêmica para *Hepatozoon canis*, com ocorrência em 55% dos cães avaliados. A prevalência de *Anaplasma sp.* foi de 2%, *Babesia canis vogeli* foi de 6% e de *Ehrlichia canis* foi de 4%. No estudo 2 concluiu-se que na região estudada não existem casos autóctones de cães infectados por *Leishmania infantum chagasi* e permitiu afirmar a ocorrência de reações cruzadas no teste de ELISA com antígeno bruto de *Leishmania infantum chagasi* com os hemoparasitos *Hepatozoon canis*, *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*. No estudo 3 concluiu-se que o município estudado pode ser considerado endêmico para hemoparasitoses, com casos autóctones, e grande taxa de reinfeção, onde as coinfeções são frequentes e apresentam manifestações clínicas e laboratoriais mais intensas que nos cães monoinfectados e ainda que o tratamento com doxiciclina foi efetivo para a melhora clínica e laboratorial dos cães monoinfectados com *Ehrlichia canis*, entretanto não foi efetiva para negatizar os cães com babesiose e anaplasiose, porém auxiliou na melhora clínica e laboratorial dos cães infectados. No estudo 4 concluiu-se que de forma geral ocorreu aumento de todos os parâmetros avaliados na urina de cães que formaram os grupos experimentais, antes do tratamento, e estes apresentaram melhora significativa destas variáveis, após o término do uso da doxiciclina, independente da negatização da infecção por hemoparasitos. No estudo 5 concluiu-se que os cães que apresentaram infecção por *Ehrlichia canis*, monoinfectados ou coinfectados com *Babesia canis vogeli* e/ou *Anaplasma platys*, podem desenvolver a síndrome do eutireoideo doente, devido à mudança do perfil hormonal durante a infecção com o hemoparasito.

Palavras chave: *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum chagasi*.

ABSTRACT

Five separate studies were conducted. The objective of this study was to determine the prevalence of *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs in rural and urban areas of Alegre, Southern Espírito Santo and to verify the presence of risk factors associated with these infections. The objective of this study was to demonstrate the presence of canine visceral leishmaniasis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and rapid immunochromatographic test, as well as to verify the occurrence of possible cross-reactions or coinfections with different hemoparasites present in the same region. Study 3 evaluated the clinical, hematological and biochemical changes of dogs with different haemolytic diseases and compared the different infectious profiles and the influence of doxycycline treatment. Study 4 evaluated the renal alterations of dogs infected with different hemoparasites by means of renal biomarkers before and after doxycycline treatment. Study 5 evaluated the presence of thyroid hormonal changes in dogs infected with *Ehrlichia canis* and coinfecting with *Anaplasma platys* and/or *Babesia canis vogeli* before and after treatment with doxycycline hydrochloride. In the first study, the existence of *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli* and *Hepatozoon canis*, in the southern region of Espírito Santo and *Ehrlichia canis* in the same area was analyzed for the first time, and that the risk factors evaluated were in dogs with hepatozoonosis but could not be associated with *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli* and *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* due to the small number of positive dogs and it is concluded that the city of Alegre is an endemic area for *Hepatozoon canis*, occurring in 55% of dogs evaluated. The prevalence of *Anaplasma sp.* was 2%, *Babesia canis vogeli* was 6%, and *Ehrlichia canis* was 4%. In the study 2, it was concluded that in the region studied there are no autochthonous cases of dogs infected with *Leishmania infantum chagasi* and allowed to affirm the occurrence of cross-reactions in the ELISA test with crude *Leishmania infantum chagasi* antigen with hemoparasites *Hepatozoon canis*, *Babesia canis vogeli* and *Ehrlichia canis*. In study 3, it was concluded that the municipality studied could be considered endemic for hemoparasitoses, with autochthonous cases, and a high rate of reinfection, where co-infections are frequent and present clinical and laboratorial manifestations more intense than in monoinfected dogs. Treatment with doxycycline was effective for the clinical and laboratory improvement of dogs monoinfected with *Ehrlichia canis*. However, it was not effective to negatively affect dogs with babesiosis and anaplasmosis, but it did help in the clinical and laboratory improvement of infected dogs. In study 4, it was concluded that, in general, there was an increase in all the parameters evaluated in the urine of dogs that formed the experimental groups, before the treatment, and these showed a significant improvement of these variables after the end of the use of doxycycline, regardless of the negativity of the infection by hemoparasites. In the study 5, it was concluded that dogs that had *Ehrlichia canis* infection, monoinfected or coinfecting with *Babesia canis vogeli* and / or *Anaplasma platys*, may develop diseased euthyroid syndrome due to a change in the hormonal profile during infection with hemoparasites.

Keywords: *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum chagasi*.

1. INTRODUÇÃO

Anaplasmose, babesiose, erliquiose e hepatozoonose são doenças causadas por diferentes hemoparasitos, sendo causas comuns de morbidade e mortalidade nos cães (Kaewkong et al., 2014). Como o vetor destas hemoparasitoses é o carrapato, torna-se difícil o controle das doenças, principalmente em áreas rurais (Silva et al., 2014). No Brasil as hemoparasitoses mais frequentes são as causadas pelos agentes do gênero *Babesia sp.*, *Ehrlichia sp.* e *Hepatozoon sp.* (Silva et al., 2014).

A *Anaplasma platys* (*A. platys*) é o parasito responsável por promover a afecção conhecida como trombocitopenia cíclica (Harvey et al., 1978). No Brasil sua prevalência não foi verificada, existindo somente informações sobre algumas regiões do país como: Ribeirão Preto (14.9%), Recife (48.78%), Paraná (19.4%), Minas Gerais (22.8%), Rio de Janeiro (17.2%) e Pantanal (7.19%) (Santos et al., 2009; Ramos et al., 2010; Da Silva et al., 2012; Costa-Júnior et al., 2013; Da Silva et al., 2016; Melo et al., 2016).

Entretanto a detecção da *A. platys* no país é geralmente baseada na observação direta do parasito, o que dificulta a determinação da prevalência da doença, pela baixa especificidade do teste (Ramos et al., 2009).

A *Babesia canis vogeli* (*B. canis vogeli*) é tida como o principal agente causador da babesiose canina no país (Passos et al., 2005). Existe grande variedade de sinais clínicos que cães com babesiose podem desenvolver, pois a doença pode se manifestar na forma crônica ou subclínica, aguda ou hiperaguda (Ramsey, 2012).

A erliquiose monocítica canina é uma doença provocada pelas bactérias do gênero *Ehrlichia*, com elevada prevalência e importância médico veterinária. Com o advento de técnicas moleculares mais modernas, diferentes patógenos como *Ehrlichia ewingii* (Oliveira et al., 2009) e *Ehrlichia muris* (Hegarty et al., 2012) têm sido correlacionados com sinais clínicos de erliquiose em cães, porém a *Ehrlichia canis* (*E. canis*) continua como o principal agente etiológico da erliquiose canina no Brasil (Vieira et al., 2011). Segundo Moraes et al. (2004), 20% da população de cães atendidos em hospitais ou clínicas veterinárias apresentam anticorpos contra *E. canis*. Nesta população, entretanto, observa-se variância de positividade em relação à localidade estudada, onde em determinadas regiões foi observado positividade em mais de 60% dos cães testados, demonstrando a grande importância da doença no país (Azevedo et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Witter et al., 2013).

No Brasil o *Hepatozoon canis* (*H. canis*) é o mais importante agente causador da hepatozoonose (Forlano et al., 2007). Sua presença já foi descrita nas regiões norte, nordeste, sul, sudeste e centro-oeste com prevalência, variando de 1 a 77,39% (Mundim et al., 2008; Spolidorio et al., 2011; Demoner et al., 2016; Gomes et al., 2016; Harvey et al., 2016; Malheiros et al., 2016).

O primeiro caso de leishmaniose visceral humana (LVH) no Brasil data de 1913, quando Migoine descreveu uma necrópsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Corumbá - MS (Alencar, 1956). No último censo realizado no ano de 2014 sobre LVH no Brasil, verificou-se que entre os anos de 2010 e 2014 foram registrados 17.164 novos casos e destes, 1.178 pessoas vieram a óbito (Brasil, 2016).

Os cães com leishmaniose podem apresentar sintomas inespecíficos, tais como febre, anemia, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia e perda progressiva de peso evoluindo para caquexia (Genaro, 1993; Baneth e Solano-Gallego, 2012). As lesões cutâneas são frequentes e apresentam padrões variados, que compreendem uma excessiva descamação da epiderme, áreas de alopecia, ulcerações e onicogribose (Feitosa et al., 2000).

A prevalência de leishmaniose visceral em cães em áreas endêmicas pode atingir de 20 a 40% da população. Acredita-se que em áreas com alta infecção em cães a incidência na população humana varie de 1 a 2% (Castro, 1996; Santa-Rosa, 1997; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Observa-se a grande importância da presença destes parasitos transmitidos por vetores em cães no Brasil. Na cidade de Alegre, região sul do estado do Espírito Santo não existe a determinação da ocorrência dos hemoparasitos citados, desta forma este estudo pretende diminuir esta lacuna no conhecimento da prevalência, alterações clínico-laboratoriais e fatores de riscos associados a estes parasitos na região.

OBJETIVO GERAL

Objetivou-se com este estudo identificar a prevalência de parasitos transmitidos por vetores em cães nas regiões rural e urbana do município de Alegre, região sul do estado do Espírito Santo e determinar a existência de correlações entre as alterações clínico-laboratoriais, fatores de riscos e eficácia do tratamento instituído.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a existência de cães infectados com os hemoparasitos: *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* pela reação em cadeia da polimerase nested (nPCR) em regiões rural e urbana do município de Alegre, região sul do estado do Espírito Santo.

Avaliar a existência de cães soropositivos para *Leishmania infantum chagasi* pela técnica de “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) e pelo teste rápido imunocromático Leishmania Ac[®] (Alere[™]) em regiões urbanas e rurais do município de Alegre-ES.

Determinar as alterações físicas de cães com suspeitas ou não de hemoparasitoses através de minucioso exame físico realizando a inspeção, palpação, percussão e auscultação.

Determinar o perfil hematológico (eritrograma, leucograma e plaquetograma) dos cães portadores de hemoparasitoses.

Determinar o perfil bioquímico sérico (proteínas totais, albumina, globulinas, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gamaglutamiltransferase, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo, ureia, creatinina e fibrinogênio) dos cães portadores de hemoparasitoses.

Determinar o perfil urinário (exames físico, químico e sedimentoscopia) dos cães portadores de hemoparasitoses.

Determinar o perfil bioquímico urinário (relação proteína/creatinina urinárias, fosfatase alcalina urinária, gamaglutamiltransferase urinária e relação gamaglutamiltransferase / creatinina urinárias).

Determinar o perfil hormonal (hormônio estimulador da tireoide-tireotropina (TSH), triiodotironina (T3), tetraiodotironina livre (T4 livre) e tetraiodotironina total (T4 total)) dos cães portadores

res de *E. canis* mono ou co-infectados e correlacionar aos valores hormonais à eficácia ou não do tratamento instituído nos cães doentes.

Instituir o tratamento para os cães doentes, independente do perfil infeccioso, com cloridrato de doxiciclina 10mg/kg/SID por 28 dias.

Determinar a eficácia do tratamento instituído através da negatização da presença de DNA dos hemoparasitos pela nested PCR e avaliar o perfil hematológico, bioquímico sérico, urinário, bioquímico urinário e hormonal dos cães infectados portadores de hemoparasitoses.

Determinar os fatores de riscos epidemiológicos dos cães com hemoparasitose de áreas urbanas e rurais no município de Alegre região sul do estado do Espírito Santo através da obtenção de dados através de formulário próprio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Anaplasma platys*

Anaplasma platys (*A. platys*) foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos no ano de 1978, porém inicialmente era conhecida como “rickettsia-like” (Harvey et al., 1978) e só posteriormente foi denominada de *Ehrlichia platys* (French e Harvey, 1983) e mais recentemente reclassificada como *Anaplasma platys* (Dumler et al., 2001). Estes microorganismos formam inclusões intra plaquetárias, tendo o formato arredondado ou em forma de feijão, possuindo uma membrana dupla. As plaquetas infectadas podem conter de um a três vacúolos com um a quinze parasitos em seu interior (Arraga-Alvorado et al., 2003). Além de parasitarem plaquetas, mais recentemente foi relatado que estes microorganismos também possuem a capacidade de infectar megacariócitos e promegacariócitos em medula óssea de cães (De Tommasi., et al., 2014).

Este patógeno tem ampla distribuição geográfica, já sendo descrito em todos os continentes, com exceção do antártico (Sanogo et al., 2003; Brown et al., 2005; Kim et al., 2006; Arraga-Alvorado et al., 2014; Bouzouraa et al., 2016). Sua prevalência em cães é bastante variável, onde se observa presença de 10 a 30.4% dos animais avaliados infectados em regiões da África (Matei et al., 2016), 16% em Cuba (Silva et al., 2016), e valores mais baixos como 4.4% na Tailândia (Liu et al., 2016) e 0.5% na Turquia (Aktas et al., 2015) analisados pela detecção de DNA através da PCR. Os resultados da soroprevalência da *A. platys* são bastante restritos, visto que muitos testes sorológicos utilizados para a detecção do parasito promovem a identificação somente do gênero, sendo necessária a realização de testes moleculares complementares para o diagnóstico correto da espécie (Heyman et al., 2007; Cetinkaya et al., 2016; Hamet et al., 2016). As avaliações sorológicas de *A. platys* demonstraram prevalência da doença em 1.5% dos cães estudados em três localidades distintas, como Estados Unidos, Canadá e Caribe (Qurollo et al., 2014) e 53% de cães na Colômbia (McCow et al., 2014).

No Brasil a prevalência da infecção por *A. platys* não foi verificada, existindo somente informações sobre algumas regiões do país como Ribeirão Preto (14.9%) Recife (48.78%) Paraná (19.4%) Minas Gerais (22.8%), Rio de Janeiro (17.2%) e Pantanal (7.19%) (Santos et al., 2009; Ramos et al., 2010; Da Silva et al., 2012; Costa-Júnior et al., 2013; Da Silva et al., 2016; Melo et al., 2016).

Entretanto no Brasil a detecção da *A. platys* é geralmente baseada na observação direta do parasito durante a realização do esfregaço sanguíneo o que dificulta a determinação da prevalência da doença, devido à baixa sensibilidade deste teste (Ramos et al., 2009).

A. platys é o parasito responsável por promover a afecção conhecida como trombocitopenia cíclica (Harvey et al., 1978; Arraga-Alvorado et al., 2003), sendo capaz de infectar diferentes espécies de animais domésticos como cães, gatos, bovinos, ovelhas e cabras (Chochlakis et al., 2009; Djiba et al., 2013; Dahmani et al., 2015; Hegarty et al., 2015; Bouzouraa et al., 2016).

Recentemente foi aventada a possibilidade de infecção por *A. platys* em seres humanos. Duas mulheres na Venezuela apresentaram sintomas inespecíficos como dores de cabeça e musculares. Nestas pacientes observaram-se inclusões intra-plaquetárias compatíveis com o parasito, sendo confirmado através da técnica da PCR. Demonstrando que este patógeno pode também se manifestar como uma zoonose (Arraga-Alvorado et al., 2014). Um segundo relato demonstrou que a sequência genética da *A. platys* encontrada em um cão com sinais clínicos da doença foi

idêntico ao encontrado em dois membros humanos da família a qual este animal fazia parte. Os seres humanos também se encontravam clinicamente sintomáticos, demonstrando dores de cabeça e fortes dores musculares (Breitschwerdt et al., 2014). Foi relatada ainda a presença de *A. platys* juntamente aos outros hemoparasitos em uma médica veterinária que apresentava distúrbios cognitivos, enxaquecas e convulsões (Maggi et al., 2013).

A transmissão do parasita de modo natural ainda não está bem definida, pois a transmissão do agente através de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* considerado como o principal possível transmissor ainda não foi bem-sucedida (Simpson et al., 1991). Entretanto apesar de sua transmissão não ter sido bem-sucedida experimentalmente, foi possível detectar através da PCR a presença do agente no carrapato marrom em diversos países (Inokuma et al., 2000; Sanao et al., 2003; Sparagano et al., 2003). A presença do parasita também foi detectada em outras espécies de carrapatos como: *Rhipicephalus turanicus*, *Dermacentor auratus*, *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes persulcatus* e *Rhipicephalus camicasi* (Parola et al., 2003; Kim et al., 2006; Cetinkaya et al., 2016; Matei et al., 2016) e em piolho mastigador como o *Heterodoxus spiniger* (Brown et al., 2005). Mais recentemente com o intuito de detectar a possibilidade da transmissão vertical do parasita, foi realizado um experimento com cadelas gestantes e não gestantes positivas para *A. platys*, que conseguiu verificar a existência através da técnica de PRC em tempo real (qPCR), a existência do DNA do agente em útero de cadelas não gestantes e em tecidos fetais das cadelas gestantes, sugerindo-se então a possibilidade da infecção por *A. platys* através da transmissão vertical durante a primeira metade da gestação de cadelas infectadas (Latrofa et al., 2016).

2.1.1. Achados clínicos e laboratoriais

Cães infectados experimentalmente com *A. platys* demonstraram que no período de maior trombocitopenia, as mórulas do parasito não foram observadas na corrente sanguínea. Estas formas só foram encontradas no início da infecção em torno do sétimo dia quando não existia uma trombocitopenia evidente (Eddlestone et al., 2007). A trombocitopenia cíclica em cães com infecção por *A. platys* ocorre imediatamente após o pico e desaparecimento da parasitemia (Harvey et al., 1978). Desta forma não é comum à visualização das mórulas quando os cães apresentam-se com as maiores taxas de trombocitopenia. Nestes animais observou-se que a porcentagem de plaquetas parasitadas não excedeu os 5% (Eddlestone et al., 2007). Acredita-se que dois mecanismos promovam a trombocitopenia, inicialmente devido à lesão direta pela replicação do parasito e num segundo momento devido a mecanismos imunomediados contra as plaquetas (Harvey et al., 1978). Em cães que apresentaram infecção intramedular por *A. platys*, foi possível observar o aumento do número de monócitos e macrófagos intramedulares, displasia medular com presença de células hiperlobuladas com desorganização nuclear, hiperplasia grave de megacariócitos juntamente com o aumento do número médio de promegacariócitos e megacariócitos e ainda eritrofagocitose por macrófagos (De Tommasi et al., 2014).

As alterações clínicas mais encontradas em cães infectados foram presença de anorexia, perda de peso, letargia, linfadenomegalia, hipertermia, hemorragias, sinais cutâneos, distúrbios músculo-esqueléticos, esplenomegalia, desidratação, uveíte (Bouzouraa et al., 2016) e diarreia (Caprariis et al., 2011). Foi relato ainda que alguns cães mesmo com a confirmação da presença de *A. platys* através da PCR, estes se apresentavam clinicamente e laboratorialmente normais (Caprariis et al., 2011).

A presença de anemia hemolítica imunomediada foi relatada em dois cães doentes (Antognoni et al., 2014). Não foi observada a presença de DNA da *A. platys* em sistema nervoso central de cães, mesmo estes se apresentando infectados com outros hemoparasitos (Cardinot et al., 2016). A taxa de óbito dos cães infectados foi de 23,8%, sendo que deste percentual 50% apresentavam-se monoinfectados (Antognoni et al., 2014). A presença de coinfeções (Gaunt et al., 2010) e outros fatores como idade, condição física, estado imunológico e estresse podem contribuir com o aumento da gravidade da doença (Suksawat et al., 2001).

Cães que foram a óbito devido à doença, o exame post-mortem revelou presença de icterícia em tecido cutâneo e subcutâneo, esplenomegalia com hiperplasia de polpa vermelha, presença de hemossiderose, edema pulmonar com presença de trombose, hiperplasia nodular hepática, glomerulonefrite membranosa com nefrose tubular e hiperplasia da série eritróide e megacariócitos em medula óssea. A morte dos cães foi atribuída à insuficiência cardiorrespiratória aguda, secundária ao desenvolvimento de anemia hemolítica imunomediada com evolução para coagulação intravascular disseminada (Antognoni et al., 2014). Cães infectados experimentalmente revelaram presença de microgranulomas pulmonares com moderada presença de infiltrados de macrófagos e linfócitos, presença de infiltrados inflamatórios em região periportal hepático e moderada hiperplasia linfóide em baço (Nair et al., 2016).

Os achados laboratoriais são diversos e podem incluir presença de anemia normocítica normocrônica, anisocitose, reticulocitose (Antognoni et al., 2014) trombocitopenia em 81% dos cães, leucocitose ou leucopenia (Bouzouraa et al., 2016), linfocitose, monocitose (De Tommasi. et al., 2014), aumento de fosfatase alcalina, bilirrubina total, parcial e fibrinogênio (Antognoni et al., 2014) além de hipoalbuminemia (Caprariis et al., 2011). Na urinálise foi observada a presença de proteinúria e hematúria (Bouzouraa et al., 2016).

2.1.2. Tratamento

A tetraciclina (Chang et al., 1997) e a enrofloxacina (Kontos e Athanasiou, 1998) na dose de 22mg/kg QUID e 5mg/Kg/BID respectivamente, por 21 dias são consideradas eficazes contra a *A. platys*, entretanto outro tratamento indicado é a utilização de 5-10mg/kg de doxiciclina a cada 12 horas por 10 dias (Greene, 2015). Porém, resultados de trabalhos recentes demonstraram que uma alta taxa de animais (61,8%) não responderam adequadamente ao tratamento com doxiciclina por 28 dias recebendo 10mg/kg SID, associados ou não a diferentes fármacos devido à presença de co-infecções não evidenciando melhora clínica e/ou laboratorial nos cães doentes (Bouzoora et al., 2016).

Existem divergências no que se refere ao aumento da severidade da doença na presença de outros hemoparasitos, sendo relatada que as coinfeções podem acarretar no aumento da gravidade da apresentação clínica e dificultar a resposta ao tratamento (Suksawat et al., 2001; Caprariis et al., 2011).

2.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico de anaplasmosose em cães não deve ser baseado exclusivamente na observação direta do parasito em lâmina, pois este teste demonstrou ter baixa sensibilidade, acarretando na não identificação de cães positivos (Ramos et al., 2009).

Ao se comparar a identificação de cães com anaplasmosose utilizando a visualização direta do parasito em esfregaço sanguíneo e a ampliação do seu DNA por meio da n-PCR, verificou-se que

o primeiro teste demonstrou tanto animais falsos negativos quanto falsos positivos. Os falsos negativos foram descritos como cães que não apresentaram a presença do parasito em lâminas e foram positivos pela n-PCR, e os falsos positivos foram animais classificados como positivos pela visualização de supostas mórulas do patógeno em plaquetas, porém negativos pela n-PCR. Ao se confrontarem os resultados dos testes verificou-se que o diagnóstico direto apresentou estatisticamente maior presença de falsos negativos que o n-PCR (Ramos et al., 2009). Os autores ainda destacam que corpúsculos de inclusão associados a processos inflamatórios, ou restos nucleares de megacariócitos que podem ser visualizados em plaquetas e podem servir como fator de confundimento no diagnóstico correto da doença (Ferreira et al., 2007).

Existem relatos da existência de reação cruzada entre *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* (Inokuma et al., 2002), entretanto, testes sorológicos utilizando a técnica de immunoblotting mais recentes, tem utilizado proteínas recombinantes específicas de *A. platys* evitando a ocorrência de reação cruzada com outros hemoparasitos (Lai et al., 2016). Um teste rápido sorológico foi recentemente lançado no Brasil, demonstrando altos índices de sensibilidade, 93.2% para *A. phagocytophilum* e 89.2% para *A. platys* e de especificidade de 99.2% para ambos, demonstrando ser um teste de triagem eficaz (Stillman et al., 2014).

Como os anticorpos podem persistir circulantes por um determinado tempo, mesmo a posteriori de a infecção ter sido debelada pelo cão, sendo através do tratamento ou de uma resposta imune efetiva, estes animais podem ser erroneamente identificados como tendo uma infecção ativa pelos testes sorológicos (Preziosi e Cohn, 2002; Moroff et al., 2014). Estes não confirmam a existência da infecção ativa, demonstram somente que os cães tiveram contato com o patógeno (Preziosi e Cohn, 2002; Ravnik et al., 2011).

A utilização dos testes moleculares como a PCR foram introduzidos na rotina veterinária para aumentar a acurácia do diagnóstico das hemoparasitoses, sendo considerado o método mais sensível e específico que os outros anteriormente utilizados (Labruna et al., 2007). Esta técnica ainda apresenta como vantagem a identificação precoce dos animais, pois em até quatro dias após a infecção pode-se identificar o DNA do parasito (Mcbride et al., 1996) impedindo desta forma que venham a se tornar fonte de infecção para outros animais (Igbal et al., 1994).

Os métodos moleculares são úteis para diferenciar as espécies e subespécies dos patógenos, sendo de grande importância clínica e epidemiológica, pois as distintas espécies e subespécies estão correlacionadas a diferentes gravidades da doença (Inokuma et al., 2002). A técnica da PCR tem cada vez mais utilizado *primers* específicos, permitindo desta forma a exata identificação do patógeno, impedindo assim que ocorra uma ampliação inespecífica de DNA, levando a uma interpretação errônea do exame. A maior especificidade dos *primers* além de permitir uma melhor identificação do parasito, permite um melhor conhecimento epidemiológico dos hemoparasitos encontrados em determinadas regiões (Greene, 2015).

2.2. *Babesia* sp.

A *Babesia* sp. é considerada como o primeiro agente infeccioso descrito como patógeno transmitido por artrópode capaz de acarretar enfermidades em animais vertebrados (Vannier et al., 2008). A babesiose acometendo animais foi descrita pela primeira vez no ano de 1888 em bovinos, nesta descrição o pesquisador observou a presença do parasito dentro de hemácias do baço dos animais necropsiados. Inicialmente o agente era descrito como: “bactéria causadora de hemoglobínúria em bovinos” (Babes, 1888). Posteriormente o parasito foi denominado de *Pyroso-*

ma bigeminum, e verificou-se que sua transmissão ocorria por meio da picada de carrapatos (Smith e Kilborne, 1893). Mais de cem espécies da *Babesia sp.* já foram identificadas, demonstrando a grandiosidade das espécies deste gênero (Levine, 1984).

Uma vez no hospedeiro os trofozoítas da *Babesia sp.* infectam os eritrócitos e ao se multiplicarem no interior das hemácias por divisão binária, resultam em merozoítos que irão invadir outros eritrócitos pelo processo de invaginação, formando um vacúolo parasitóforo. A membrana do vacúolo desintegra-se gradualmente e desta forma o parasito encontra-se envolto somente pela membrana da hemácia do hospedeiro (Rudzinska et al., 1976).

Como a *Babesia sp.* infecta exclusivamente eritrócitos a resposta imune que leva a proteção da doença depende da apresentação dos parasitos as células que tem a função de reconhecer os antígenos, como os linfócitos T CD4+, com a consequente destruição do agente. Os linfócitos T juntamente com os macrófagos são responsáveis pela produção do interferon gama (IFN- γ) que atua destruindo as células parasitadas intra esplênica (Homer et al., 2000). Em ratos infectados que possuíam uma resposta efetiva da produção de linfócitos T CD4+ e ativação da resposta do Tipo Th-1, demonstrou-se que estes animais foram capazes de debelar a doença quando comparados aos ratos que não conseguiram responder a infecção com aumento dos mesmos linfócitos (Ruebush e Hanson, 1980). Verificou-se ainda que ratos que apresentavam diminuição exclusivamente de linfócitos T CD8+ não apresentaram dificuldade em debelar a doença (Igarashi et al., 1994). Desta forma acredita-se que o aumento da linhagem dos linfócitos T CD4+ seja a responsável pela proteção efetiva contra o parasito. Entretanto embora se saiba a linhagem de células que são responsáveis pela resistência contra o patógeno, não se conhece ao certo os mecanismos efetores que culminam nesta proteção (Homer et al., 2000).

Existem poucos dados genômicos ao que se refere a *Babesia canis*, e o pouco que se sabe é que existem duas proteínas multigênicas que permitem a ligação entre o parasito e os eritrócitos, que são as proteínas bc28 e Bd27 (Carcy et al., 2006) acredita-se que uma das duas ou ambas as proteínas possam servir de sinalizadoras para o sistema imune do hospedeiro, para que este inicie a cascata de mecanismos imunes efetores na tentativa de promover a eliminação dos parasitos, porém mais estudos ainda são necessários (Yang et al., 2012). No que se refere a *Babesia gibsoni* que também é capaz de produzir doença nos cães, foi detectado que a proteína BgAMA-1, presente na membrana apical do parasito é capaz de ser reconhecida como antígeno pelo hospedeiro e carreta a ativação da resposta imune (Zhou et al., 2006).

Ao se testar a capacidade dos anticorpos neutralizantes contra o parasito utilizando soro imune para verificar se estes conseguiam conter a infecção, foi possível demonstrar que a capacidade de debelar a doença foi parcialmente efetiva, pois os anticorpos foram capazes de retardar o surgimento dos sinais clínicos, contudo não impediu o desenvolvimento da doença. Ainda em relação à proteção produzida pelos anticorpos verificou-se que a utilização de anticorpos Anti – *Babesia sp.* conseguiram neutralizar os trofozoítas e os merozoítas na fase extra eritrocitária da doença. Desta forma observa-se que os anticorpos possuem ação limitada, porém importante em determinadas fases do ciclo do parasito no hospedeiro, e que seu maior efeito protetor ocorre quando o patógeno chega a corrente sanguínea em sua forma livre (Abdalla et al., 1978).

Entretanto, assim como outros agentes infecciosos, as *Babesias* possuem a capacidade de conduzir respostas inapropriadas do sistema imune, na tentativa de promover seu escape, o que leva ao estabelecimento da doença. É sugerido que algumas espécies de *Babesias* possuem a habilidade de promover a mudança na expressão de proteínas da membrana dos eritrócitos parasita-

dos, impedindo que estes sejam reconhecidos de forma efetiva pelo sistema imune do hospedeiro (Echaide et al., 1998). Outra estratégia de evasão do sistema imune pelos parasitos parece ser a modulação do sistema complemento do hospedeiro, visto que nenhuma lise eritrocitária mediada por este sistema foi observada em células parasitadas (Chapman e Ward, 1977).

No Brasil os cães podem ser parasitados por diferentes espécies de carrapatos que podem transmitir a babesiose como: *Amblyomma auereolatum*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum* (Labruna e Pereira, 2001) e *Boophilus microplus* (Oyafuso et al., 2002), entretanto o *Rhipicephalus sanguineus* é descrito como o principal vetor da doença no país (Passos et al., 2005).

As Babesias possuem a capacidade de serem transmitidas a novas gerações de carrapatos, tanto pela forma trans-estadial (é passado para as diferentes fases de seu desenvolvimento), tanto quanto pela forma trans-ovariana. Esta estratégia permite que a *Babesia sp.* continue sendo passada de geração em geração, mesmo que os carrapatos não consigam ser reinfetados, fazendo com que o parasito sobreviva por longos períodos na população de artrópodes (Pantchev et al., 2015).

A taxa de sucesso da transmissão dos parasitos através dos carrapatos é devido à fisiologia adaptada do artrópode em conseguir alimentar-se de sangue por longos períodos, permitindo desta forma que o patógeno seja transmitido ao vetor de forma efetiva e pela modulação da resposta imune do hospedeiro por meio de moléculas bioativas presentes na saliva do artrópode (Francischetti et al., 2009).

A principal forma de infecção dos cães pelo parasita ocorre devido à transmissão por picada de carrapatos, entretanto, outras formas de contaminação foram aventadas, como por meio de brigas devido ao contato com sangue infectado (Jefferies et al., 2007), transmissão transplacentária (Fukumoto et al., 2005) e por meio de transfusão sanguínea. Pesquisadores italianos demonstraram que apesar dos cuidados ministrados aos cães que são triados para serem doadores de sangue, estes possuíam a mesma soroprevalência da população de cães não doadores. Demonstrando que mesmo estes cães que utilizavam ectoparasiticidas regularmente a taxa de exposição ao patógeno foi semelhante a população canina em geral (Vascellari et al., 2016).

Diferentes espécies já foram descritas como causadoras da doença em cães em diferentes países, dentre elas podemos citar: *Babesia annae*, *Babesia canis*, *Babesia conradae*, *Babesia rossi*, *Babesia gibsoni* e *Babesia vogeli* (Uilenberg et al.; 1989), porém no Brasil a *Babesia vogeli* é tida como o principal agente causador da babesiose canina (Passos et al., 2005).

A babesiose canina no Brasil já foi descrita em diversas regiões (Guimarães et al., 2004; Trapp et al., 2006; De Sousa et al., 2013; Melo et al., 2016) sendo observado a soroprevalência de *Babesia sp.* com valores de 8.1 a 91% no sul (Gottlieb et al., 2016; Malheiros et al., 2016), 13.15 a 81.6% no centro-oeste (De Sousa et al., 2013; Minervino et al., 2015) 16.1% no nordeste (Da Costa et al., 2015) e 66.9 a 73.3% no Sudeste (Ribeiro et al., 1990; Guimarães et al., 2002). A infecção pelo parasita por meio da detecção do DNA pela PCR revelou valores de 0.9 a 15.7% no nordeste (Da Costa et al., 2015; Rotondano et al.; 2015; Moraes et al., 2016), 4% no sul (Malheiros et al., 2016), 3.13% no norte (Melo et al., 2016) e 6.8% no sudeste (Lemos et al., 2012).

2.2.1. Sinais clínicos e laboratoriais:

A gravidade da infecção nos cães pode variar de leve até a apresentação de quadros com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo associados à síndrome da resposta inflamatória sistêmica, distúrbios no sistema de coagulação e síndrome da disfunção múltipla dos órgãos (Rafaj et al., 2013; Kules et al., 2016). A babesiose pode ser extremamente grave, lesionando diferentes órgãos e tecidos como o fígado, rins, pulmões, pâncreas e músculos (Kules et al., 2016). Fatores como idade, imunocompetência, doenças concomitantes e a espécie do patógeno envolvida estão diretamente relacionados com a evolução da doença (O'Dwyer e Massard, 2002). Existe uma grande variedade de sinais clínicos que os cães infectados podem desenvolver e a doença pode se manifestar na forma crônica ou subclínica, aguda e hiperaguda (Ramsey, 2012). As alterações clínicas de cães com babesiose são diversas e inespecíficas, pois o agente é capaz de afetar diferentes órgãos. Observa-se a presença de sinais clínicos não específicos como hiporexia, desidratação, palidez de mucosas, febre, taquicardia, taquipneia, dispneia, mucosas congestionadas, linfadenopatia, mucosas ictéricas, presença de vômito e diarreia (Sudhakara et al., 2016), anorexia, depressão, letargia e perda de peso (Nalubamba et al., 2015) nos animais infectados, e desta forma a doença pode ser confundida com infecção causada por outros hemoparasitos.

A hemólise em animais com babesiose é comumente observada, pois se sabe que as hemácias ao serem infectadas pelo parasito incorporam diferentes antígenos dos patógenos. Estes antígenos induzem a produção de anticorpos do hospedeiro na tentativa de eliminação dos eritrócitos parasitados pelo sistema fagocitário mononuclear. Entretanto a destruição das hemácias fagocitadas acarreta na liberação de antígenos solúveis do parasito na corrente sanguínea que acabam se fixando em hemácias e plaquetas saudáveis. Este evento promove um ataque a estas células pelos anticorpos do hospedeiro culminando em anemia hemolítica imunomediada e trombocitopenia. Desta forma, pode-se observar que a resposta imune do hospedeiro não acarreta somente em benefício, podendo promover em alguns casos o agravamento da doença (Adachi et al., 1994; Adachi et al., 1995).

As alterações laboratoriais descritas na doença são: presença de hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipoglicemia (Sudhakara et al., 2016), aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) compostos nitrogenados séricos, creatinina sérica (Sudhakara et al., 2016; Kules et al., 2016), creatinina urinária (Zygner et al., 2013) aumento de amilase, lipase e cretino quinase (Kules et al., 2016). Diminuição da concentração de hemoglobina e contagem de eritrócitos além de trombocitopenia. Na urinálise observou-se presença de hematúria (Sudhakara et al., 2016). Os piores prognósticos de cães acometidos por babesiose que acarretam em alta taxa de mortalidade revelaram a presença de moderada anemia, tromboctopenia grave, leucopenia, hiperlactatemia, hiperfosfatemia, hipertrigliceridemia, associado à hipoproteinemia (Eichenberger et al., 2016).

2.2.2. Diagnóstico

O exame para a identificação da *Babesia sp.* por microscopia de luz é considerado de execução simples, baixo custo (Dell' Porto et al., 1993) e com especificidade que varia de alta (Dell' Porto et al., 1993) a moderada, embora exija um avaliador bem treinado (Miró et al., 2015). A sensibilidade do teste, no entanto, é descrita como baixa, desta forma sua utilização como teste único não deve ser preconizado (Greene, 2015).

Sabe-se que o eritrócito parasitado torna-se deformado e mais pesado pela presença do parasito intracelular, desta forma estas hemácias têm a tendência a se depositarem em vasos periféricos

de pequeno calibre como os auriculares e os dos coxins. Estes se tornam excelentes locais para coleta de sangue para a pesquisa do hemoparasito (Irwin e Hutchinson, 1991). Devido ao aumento do peso celular as hemácias parasitadas também são mais facilmente encontradas próximas da capa leucocitária (Yamasaki et al., 2000). Assim a escolha do local de coleta do material biológico para ser analisado por este método é de extrema importância, permitindo maiores taxas de sucesso na observação do patógeno (Irwin e Hutchinson, 1991).

O diagnóstico parasitológico da *Babesia sp.* em cães ocorre com maior frequência quando o animal encontra-se na fase aguda da doença que se correlaciona com o aumento da parasitemia. Nos animais cronicamente infectados a identificação do parasito no sangue torna-se menos evidente assim como em cães assintomáticos (Irwin e Hutchinson, 1991), devido a este fato, os testes sorológicos e moleculares se mostram como melhores opções em cães cronicamente doentes.

Os testes sorológicos podem ser utilizados para detecção de cães doentes, entretanto, existe a detecção de falsos negativos utilizando-se os testes sorológicos (Bobade et al., 1989; Miró et al., 2015). Um estudo demonstrou que o teste ELISA falhou na detecção de 36,1% dos cães que se apresentavam parasitologicamente positivos para *Babesia canis* (Bobade et al., 1989). E, ainda há observação de falsos positivos com a utilização da RIFI para *Babesia sp.* (Miró et al., 2015)

Existem relatos da ocorrência de reação cruzada em cães com hemoparasitoses, utilizando-se testes sorológicos (Oliveira et al., 2008; Laranjeiras et al., 2014; Zanette et al., 2014), como por exemplo a verificação da existência de reação cruzada de *Babesia canis* com *Leishmania sp.* (Oliveira et al., 2008; Laranjeiras et al., 2014; Zanette et al., 2014) e entre *Theileria anne* e *Babesia canis* (Miró et al., 2015).

Para evitar este tipo de reação cruzada, testes sorológicos utilizando proteínas antigênicas recombinantes têm sido testadas para *Babesia gibsoni* (Goo et al., 2009; Mandal et al., 2014; Mandal et al., 2016). Estes testes têm se mostrado bastante eficazes em não promover reação cruzada entre outros patógenos antígenicamente semelhantes a *Babesia gibsoni* como a *Babesia canis*, *Babesia rossi*, *Neospora caninum*, *Leishmania infantum* (Goo et al., 2009), *Erlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Dirofilaria immitis* (Mandal et al., 2014; Mandal et al., 2016). Testes sorológicos com proteínas recombinantes utilizando-se as técnicas de Western Blot (Goo et al., 2009), ELISA, dot-ELISA demonstraram alta sensibilidade e especificidade na detecção da *B. gibsoni* sem a ocorrência de reação cruzada com outros parasitos (Mandal et al., 2016). O Western blot demonstrou ainda ser capaz de detectar anticorpos em cães infectados tanto na fase aguda da doença iniciando-se a observação de identificação de anticorpos a partir de dez dias pós-infecção, quanto na fase crônica da doença, sendo ainda mantido a observação de cães positivos 442 dias após a infecção (Goo et al., 2009).

Ao se comparar a detecção de cães com babesiose utilizando o método molecular e sorológico foi possível observar que a PCR conseguiu identificar com maior sensibilidade a presença de cães doentes, os autores destacaram a importância da utilização do PCR para o correto diagnóstico da babesiose canina (Schaarschmidt et al., 2006).

Os testes moleculares têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico da babesiose canina (Rjeibi et al., 2016; Starkey et al., 2016; Cardinot et al., 2016; Cardoso et al., 2016), demonstrando alta sensibilidade (Peleg et al., 2010), permitindo determinar a parasitemia (Matsuu et al., 2005), além de identificar as subespécies existentes em diferentes regiões (Costa et al., 2012). Pacientes humanos infectados com *Babesia microti* a PCR em tempo real (qPCR) foi mais efi-

caz em detectar pacientes ainda infectados após a instituição do tratamento do que através da identificação do patógeno por microscopia de luz, demonstrando desta forma ser mais sensível em pacientes que ainda encontravam-se doentes (Wang et al., 2015).

Mais recentemente outro teste diagnóstico denominado de “Amplificação isotérmica mediada por ciclos – LAMP” também baseado na identificação de DNA do parasito, foi proposta para detecção de babesiose em cães, esta técnica apresenta vantagens por ter alta sensibilidade e promover a identificação precoce de agentes infecciosos mesmo antes da detecção por testes sorológicos. Em comparação com a PCR a LAMP demonstrou ser vantajosa devido à simplicidade da reação, por apresentar maior eficácia na ampliação do DNA, sendo capaz de detectar quantidades menores do DNA do parasito, além de não necessitar de instrumentos de alta precisão para ser realizada, podendo desta forma ser adquirida mais facilmente pelos laboratórios de análise e ser utilizada para diagnóstico a campo (Mandal et al., 2015).

Outra técnica recente proposta para detecção de babesiose canina avaliou o perfil de proteínas de cães com *Babesia canis* utilizando a espectrometria de massa. Durante a análise foi possível verificar que a proteína 51-52 KD estava presente somente em cães infectados. Desta forma verificou-se que a proteína é encontrada somente em soro de cães infectados, podendo servir como um marcador da doença (Adaszek et al., 2014).

2.2.3. Tratamento

O tratamento para a babesiose canina pode se dar por diferentes medicamentos. Um estudo demonstrou que ao ser infectados pela *Babesia sp.*, os cães diminuíram a quantidade de linfócitos CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD21 + e após o tratamento com o dipropionato de imidocarb na dose de 5 mg/kg, observou-se aumento na quantidade de linfócitos destes cães, mesmo que ainda abaixo dos valores de normalidade. Desta forma a resolução dos sinais clínicos dos cães infectados está associada à estimulação da imunidade celular dependente das células T CD4 + e que após a administração do medicamento este foi capaz de negativar a presença do patógeno, o que permitiu que a população de linfócitos aumentasse (Adaszeck et al., 2015).

Foi proposto que cães cronicamente parasitados, porém assintomáticos eram capazes de tornarem-se resistentes à reinfecção, tal proposição confirmou-se através dos resultados encontrados em um estudo que utilizou dois grupos de cães experimentalmente infectados, o primeiro grupo foi tratado com dipropionato de imidocarb, que promove a eliminação do parasito no hospedeiro, e o segundo grupo não recebeu nenhum tipo de medicação, ambos os grupos após seis meses foram reinfecados. Verificou-se que somente o grupo dos animais tratados apresentou novamente os sinais clínicos da doença. Confirmou-se que a utilização do fármaco foi capaz de debelar os parasitos e que concomitantemente ao seu uso, os cães não foram capazes de produzir uma taxa de manutenção de anticorpos protetores, o que ocorreu no grupo dos não tratados. Conclui-se então que os cães cronicamente infectados eram capazes de manter níveis de anticorpos que impediram o surgimento da doença clínica na reinfecção. Em cães, a presença de anticorpos promovida por uma parasitemia baixa de forma crônica parece ser necessária para que estes animais não se tornem clinicamente doentes devido a uma nova infecção (Brandão et al., 2005). Sugerindo desta forma que em cães a presença de anticorpos Anti-*B. canis* seja capaz de impedir a manifestação clínica da doença nas reinfecções.

Há evidências que a duração da imunidade protetora da *Babesia canis* em cães é de quatro a cinco meses após a infecção e que não existe proteção cruzada entre as diferentes cepas de *Babesia*

(Vercammem et al., 1997). A resposta imune desenvolvida pelo cão necessita de estimulação constante (Bobade et al., 1989) e mesmo que o animal responda imunologicamente ao patógeno este pode não ser efetivamente eliminando, acarretando na cronicidade da doença (Taboada e Merchant, 1991) culminando na exacerbação do quadro clínico do paciente e dificultando o tratamento.

A doxiciclina é outro fármaco que pode ser utilizado com eficácia como alternativa ao tratamento contra babesiose, sendo utilizado como monoterapia (Niwetpathomwat, 2006) ou em associação com enrofloxacin e metronidazol (Lin e Huang, 2010).

A associação de atovaquona+proguanil é um medicamento indicado para tratamento contra malária. Entretanto um estudo cujo objetivo foi testar a eficácia do fármaco contra babesiose canina, mostrou que este medicamento pode se tornar uma alternativa para cães com infecção aguda ou para cães que apresentem cepas resistentes a doxiciclina. Os autores ressaltaram que alguns cães não negativaram a parasitemia da doença, mesmo com uma segunda dose do fármaco, sendo desta forma necessário mais estudos para a avaliação da eficácia do medicamento (Iguchi et al., 2014).

Outros fármacos já foram citados como forma de tratamento para cães infectados por espécies pertencentes ao grupo das grandes babésias, como o acetato de diminazeno, isetionato de fenamidina e o isetionato de pentamidina, no entanto estes fármacos mostram-se eficazes na eliminação da *B. canis* mas não da *B. gibsoni*. Sendo observado que em cães infectados por *B. gibsoni* a utilização destes medicamentos promove uma redução na morbidade e mortalidade (Greene, 2015).

2.2.4. Prevenção

Existem diferentes formas de prevenção à doença. Uma delas é a realização da vacinação de cães que vivem em áreas endêmicas. Recentemente foi testada uma vacina recombinante para *Babesia gibsoni*, a qual promoveu uma proteção parcial à doença. Os cães que utilizaram esta vacina apresentaram alterações clínicas mais brandas que o grupo controle. Demonstrando assim que este tipo de abordagem clínica pode ser utilizada em áreas endêmicas da doença (Cao et al., 2013), porém a imunidade induzida pela vacina difere dependendo da espécie a qual o cão é desafiado (Schtters et al., 2009).

Métodos de controle de carrapatos tem se mostrado eficazes na prevenção da babesiose canina, podendo chegar a um período de até 12 semanas sem parasitismo por carrapatos, após uma aplicação do carrapaticida fluralaner. Os animais foram desafiados com *Dermacentor reticulatus* infectados com *Babesia canis*, entretanto nenhum dos cães adquiriu a doença durante este período (Taenzler et al., 2016) Outro carrapaticida contendo uma associação de fipronil e permetrina foi capaz de diminuir em 87.5% a taxa de infecção por *B. canis* em cães desafiados por 28 dias com carrapatos infectados após a aplicação do fármaco (Jongejan et al., 2015).

2.3. *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis (*E. canis*) é uma bactéria gram negativa obrigatoriamente intracelular que coloniza linhagens monocíticas. Pertencente à ordem *Rickettsiales* e família *Anaplasmataceae* (Dumler et al., 2001). No Brasil sua primeira descrição data do ano de 1973 na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais (Costa et al., 1973), e desde então tem sido descrita em diversas regiões do País (Sousa et al., 2010; Carlos et al., 2011; Lasta et al., 2013; Paulan et al., 2013;

Spolidorio et al., 2013; Vieira et al., 2013; Zanette et al., 2014; Cardinot et al., 2016; Gottlieb et al., 2016).

A erliquiose monocítica canina é uma doença provocada pelas bactérias do gênero *Erlichia*, com elevada prevalência e importância médico veterinária. Com o advento de técnicas moleculares mais modernas, diferentes patógenos como *E. ewingii* (Oliveira, et al., 2009) e *E. muris* (Hegarty et al., 2012) têm sido correlacionados com sinais clínicos de erliquiose em cães em diversos países, porém a *Erlichia canis* é considerada o principal agente etiológico da erliquiose canina no Brasil (Vieira et al., 2011).

Segundo Moraes et al (2004), 20% da população de cães atendidos em hospitais ou clínicas veterinárias no Brasil apresentam anticorpos contra *E. canis*. Nesta população, entretanto, observa-se variação de positividade em relação à localidade estudada, sendo que em determinadas regiões foi observado positividade em mais de 60% dos cães testados, demonstrando a grande importância da doença no Brasil (Azevedo et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Witter et al., 2013).

O carrapato *Dermacentor variabilis* foi capaz de transmitir o parasito de modo experimental (Johnson et al., 1998), entretanto no Brasil o *Ripicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) conhecido popularmente como “carrapato marrom” é o carrapato que mais comumente parasita cães de áreas urbanas. É considerado o principal responsável pela transmissão da *E. canis* no país (Dantas-Torres, 2009). A transmissão da *E. canis* entre os *R. sanguineus* ocorre somente pela forma transestadial, na qual os carrapatos se infectam durante o repasto sanguíneo de cães infectados e transmitem o parasito para as seguintes fases de seu desenvolvimento. Estes artrópodes podem transmitir a doença para cães susceptíveis por mais de 150 dias após sua infecção (Groves et al., 1975). Ainda não foi possível determinar qual o tempo mínimo que o carrapato precisa se manter fixo ao cão para que este seja capaz de transmitir a *E. canis* ao seu hospedeiro. No entanto, um estudo conseguiu determinar que mesmo com poucas horas de fixação foi possível ocorrer a infecção dos cães pelo patógeno (Fourie et al., 2013).

2.3.1. Alterações clínicas

A erliquiose monocítica canina é uma doença de elevada importância médico veterinária, pois afeta um grande número de cães. A doença é subdividida em três fases: aguda, subclínica e crônica (Ramsey et al., 2010). O curso da fase aguda é de aproximadamente duas a quatro semanas e apresenta-se com sinais clínicos inespecíficos destacando-se a presença de apatia, anorexia, perda de peso, corrimento nasal e ocular, linfadenopatia, dispneia, hepatoesplenomegalia, palidez de mucosas, letargia, epistaxe, (Harrus et al., 1997; De Castro et al., 2004; Moreira et al., 2005; Sousa et al., 2010) febre, (Harrus et al., 1997; De Castro et al., 2004; Moreira et al., 2005; Sousa et al., 2010; Moonarmat et al., 2014; Nair et al., 2016) e glomerulonefrites (Codner et al., 1992; De Castro et al., 2004).

Sinais clínicos menos comuns nesta fase vêm sendo relatado por diferentes autores, como presença de ascite, edema e alterações neurológicas, sendo que, em alguns casos foi observada a presença de mórula de *E. canis* no líquido cefalorraquidiano de cães com meningoencefalite (Meinkoth, et al., 1989; Baba et al., 2012; Kaewmongkol et al., 2016). Outros sinais clínicos incomuns são a presença de vômito, diarreia e desconforto abdominal que atingem de 10 a 15 % dos cães (Harrus et al., 1997). Acredita-se que os sintomas gastrointestinais decorram de afecções hepáticas devido à grave degeneração hepática centrolobular difusa, pela presença de células mononucleares nos sinusóides hepáticos o que pode acarretar necrose de hepatócitos (De

Castro et al., 2004; Rungsipipat et al., 2009; Mylonakis et al., 2010) e presença de microgranulomas com infiltrados inflamatórios de macrófagos e linfócitos (Nair et al., 2016).

Foi relato a presença de pneumonia intersticial associada à hipertensão pulmonar em um cão com o diagnóstico de erliquiose canina. O animal apresentou melhora do quadro clínico após a instituição do tratamento a base de doxiciclina. Os autores destacaram a necessidade da doença ser considerada como diagnóstico diferencial em cães que apresentem quadros de dispnéia e hipertensão pulmonar em áreas endêmicas do patógeno (Toom et al., 2016). Em cães infectados experimentalmente foi possível observar ao exame histopatológico, presença de microgranulomas pulmonares com presença de infiltrados perivasculares de macrófagos e linfócitos (Nair et al., 2016).

A fase subclínica da erliquiose canina inicia-se de seis a nove semanas após a infecção, podendo se perpetuar por anos (Codner e Farris-Smith, 1986; Warner et al., 1997; Ramsey et al., 2010). Os animais que não apresentam uma resposta imune eficaz são incapazes de alcançar a cura (Ramsey et al., 2010), permitindo então que o parasito persista intracelularmente em órgãos linfoides, podendo levar ao estabelecimento da forma crônica da doença (Mylonakis et al., 2004; Ramsey et al., 2010). A cronicidade da infecção acentua os sintomas encontrados na fase aguda, e o quadro mórbido da doença agrava-se pela pancitopenia devido à hipoplasia da medula óssea, podendo acarretar no óbito do animal (Mylonakis et al., 2004). A gravidade da doença pode variar de acordo com a cepa de *E. canis* (Rudoler et al., 2012), estado imunológico do animal (Nyindo et al., 1980) e a raça do cão infectado (Harrus et al., 1997).

Apesar da erliquiose ser uma doença com sinais clínicos inespecíficos, alguns autores a correlacionam mais comumente em determinadas regiões a presença de palidez de mucosa (Sousa et al., 2010), linfadenopatia, alterações pulmonares (Witter et al., 2013) e anorexia (Ueno et al., 2009), demonstrando que a frequência destas alterações clínicas podem se diferenciar dependendo da região estudada. É de importante valor a detecção destas particularidades locais, visto que a maioria dos médicos veterinários no Brasil utiliza a presença de achados clínicos para fazer o diagnóstico presuntivo de *E. canis* (Vieira et al., 2011).

Na cidade do Rio de Janeiro foi evidenciada a presença de duas cepas diferentes de *E. canis*, classificadas como 56C e 70C, estas cepas promoveriam manifestações clínicas e hematológicas distintas da doença. Os autores destacaram que o surgimento de diferentes genótipos do parasito tem evidenciado diferentes aspectos fenotípicos, resultando em diferentes formas de apresentação da afecção o que leva a um diagnóstico ainda mais complexo da doença (Ferreira et al., 2014).

2.3.2. Alterações laboratoriais

As alterações hematológicas mais comuns em cães com erliquiose são a presença de anemia, trombocitopenia e leucopenia (Moreira et al., 2003; De Castro et al., 2004; Bulla et al., 2004; Nakaghi et al., 2008; Rungsipipat et al., 2009; Ueno et al., 2009; Sousa et al., 2010; Carlos et al., 2011; Asgarali et al., 2012; Da Silva et al., 2012; Kelly et al., 2013; Witter et al., 2013; Santamaria et al., 2014). Outras alterações menos frequentes observadas em cães com erliquiose são a presença de leucocitose (Moreira et al., 2003; Scorpio et al., 2008; M'Ghirbi et al., 2009) eosinofilia (Moreira et al., 2003), eosinopenia (De Castro et al., 2004; Bhadesiya e Raval, 2015; Gianopoulos et al., 2016) monocitose (De Castro et al., 2004), monocitopenia (Moreira et al., 2003; Gianopoulos et al., 2016), neutrofilia (De Castro et al., 2004; Sousa et al., 2010; Bhade-

siya e Raval, 2015; Gianopoulos et al., 2016), linfopenia (Harrus et al., 1997; Witter et al., 2013; Bhadesiya e Raval, 2015; Gianopoulos et al., 2016) e presença de macroplaquetas (Santamaria et al., 2014).

A grande variação dos parâmetros hematológicos de cães com erliquiose foi creditada à fase clínica da doença em que estes animais se encontram (Harrus et al., 1997) e as alterações de leucometria foram correlacionados a leucogramas de estresse, inflamatórios e por estimulação antigênica (Gianopoulos et al., 2016). As alterações hematológicas que puderam ser correlacionadas à presença da doença foram a presença de anemia, linfopenia e trombocitopenia (Witter et al., 2013).

No entanto, outros autores demonstraram que existem divergências ao que se referem às mudanças na leucometria de cães infectados experimentalmente, quando comparados a cães com infecções naturais, sendo que neste último grupo não foi possível estabelecer padrões característicos da doença na mudança dos perfis de leucócitos, demonstrando assim uma grande variedade de resposta natural frente a infecção (Gianopoulos et al., 2016).

Outras alterações hematológicas presentes nos cães doentes foram: diminuição do valor de hematócrito, do número total de eritrócitos e aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Bhadesiya e Raval, 2015). Ao se comparar a gravidade das alterações hematológicas de cães experimentalmente infectados com diferentes hemoparasitos, verificou-se que os cães infectados com *E. canis* foram os que apresentavam maior severidade (Nair et al., 2016).

Quando se comparou a presença de *E. canis* em cães não trombocitopênicos e trombocitopênicos observou-se que este último grupo apresentava maior probabilidade de estarem parasitados. O mesmo estudo ainda comparou a gravidade da trombocitopenia às maiores taxas da presença do parasito, encontrando valores significativos quando a trombocitopenia apresentava-se de forma grave (Bulla et al., 2004). Para cada decréscimo de 10.000 plaquetas ocorreu um aumento de 15% no risco do cão estar com erliquiose (Moonarmart et al., 2014).

Na avaliação das proteínas séricas de cães infectados com *E. canis* foram observadas presença de hipoproteinemia (De Castro et al., 2004; Watanabe et al., 2006; Rungsipat et al., 2009; Bhadesiya e Raval, 2015), hipoalbuminemia (Heeb et al., 2003; Mylonakis et al., 2004; Watanabe et al., 2006; SOUSA et al., 2010; Rungsipat et al., 2009) e hipoglobulinemia (Sousa et al., 2010), estes achados podem ser correlacionados a presença de alterações hepáticas graves ou afecções gastrointestinais. A presença de hipoalbuminemia pode ainda estar relacionada na fase aguda da doença devido ao sequestro ou edema decorrente da vasculite causada pela *E. canis* e na fase crônica pela perda glomerular decorrente da glomerulonefrite (Sousa et al., 2010). Outros autores porém encontraram presença de hiperproteinemia (Asgarali et al., 2012; Witter et al., 2013) e hiperglobulinemia (Codner e Farris-Smith., 1986; Heeb et al., 2003; Rungsipat et al., 2009) nestes cães, correlacionaram este tipo de resposta a tentativa do organismo debelar o microorganismo, visto que a erliquiose canina é uma doença de caráter prolongado que promove uma forte resposta imune do animal, muitas vezes com eficácia inadequada (Harrus et al., 1997).

A atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (ALT) e alanino aminotransferase (AST) nos cães com erliquiose podem encontrar-se aumentadas (Rungsipat et al., 2009; Bhadesiya e Raval, 2015; Do Carmo et al., 2015), visto que o fígado é um dos órgãos alvos da *E. canis* (De Castro et al., 2004; Mylonakis et al., 2010).

As concentrações de ureia (Santarém et al., 2008), e creatinina nos cães infectados podem revelar-se aumentadas (Santarém et al., 2008; Bhadesiya e Raval, 2015), o que indica acometimento renal pela consequente injúria da membrana basal dos glomérulos em consequência do aumento de anticorpos e deposição de imunocomplexos (Burghen et al., 1971).

As alterações laboratoriais em cães com erliquiose associadas a altas taxas de óbito, próximo aos 100% foi associada à presença de anemia e leucopenia graves, aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e presença de hipocalcemia (Shipov et al., 2008). Altos níveis de mediadores da inflamação como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 6 (IL-6) e altos níveis marcadores de estresse oxidativo como o nitrito/nitrato (NOx), peroxidação lipídica (TBARS), produtos de oxidação proteica (AOPP) e aumento da atividade da glutatona redutase (GR) foram observados em cães na fase aguda da erliquiose (Do Carmo et al., 2015), e demonstra um estado pró inflamatório com presença de estresse oxidativo. Estas alterações podem estar envolvidas na fisiopatogenia da doença aumentando sua gravidade (Da Silva et al., 2013).

2.3.3. Prevalência da doença

No Brasil a *E. canis* já foi identificada nas cinco regiões do país (Spolidorio et al., 2013; Roton-dano et al., 2015; Cardinot et al., 2016; Gottlieb et al., 2016; Melo et al., 2016) Observa-se, entretanto uma grande variação da soroprevalência em relação à região estudada, onde na cidade de Campina Grande 72,5% dos cães avaliados encontravam-se sorologicamente positivos, em Patos 69,4%, Cuiabá 70,1%, Londrina 23% e Belo Horizonte 35,9% (Moreira et al., 2003; Trapp et al., 2006; Azevedo et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Witter et al., 2013).

Os altos índices de positividade observados nos últimos anos (Azevedo et al., 2011; Paulan et al., 2013; Pinhanelli et al., 2015), levantam grande preocupação, visto que muitos cães podem manter-se por vários anos com a forma subclínica da doença (Ramsey et al., 2010). Desta forma, estes animais podem atuar como fonte de infecção para cães saudáveis e canídeos selvagens, neste último caso sendo extremamente preocupante, visto que autores correlacionaram como possível diminuição da matilha de canídeos silvestres à beira da extinção, a morte de filhotes pelo contato dentre outros patógenos à presença de erliquiose canina (Woodroffe et al., 2012).

2.3.4. Potencial zoonótico

A *E. chaffeensis* é o agente etiológico da erliquiose monocítica humana, e a *E. ewingi* causa a erliquiose granulocítica humana (Olano e Walker, 2002). Diferentes estudos porém identificaram a presença de anticorpos anti-*Erlichia canis* em seres humanos assintomáticos (Perez et al., 1996; Silva et al., 2014) inclusive em inquéritos sorológicos de triagem no Brasil (Vieira et al., 2013). Uma questão porém sobre *E. canis* é que este patógeno possa atuar como zoonose, um estudo venezuelano correlacionou à presença do parasito pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 30% dos casos em que os pacientes apresentavam sinais clínicos compatíveis com erliquiose monocítica humana (Perez et al., 2006). No Brasil a ocorrência de parasitismo humano por *Rhipicephalus sanguineus* foi descrita, servindo de alerta para o risco de uma potencial transmissão de *E. canis* para seres humanos (Dantas-Torres et al., 2006). Mais recentemente foi verificada a presença de anticorpos contra *E. canis* em 35% das bolsas de sangue em um banco de sangue humano na Costa Rica e destas foram possíveis identificar o DNA do parasita em 3,6% das amostras, o que mostra a existência da infecção pela *E. canis* em seres humanos (Bouza-Mora et al., 2016).

2.3.5. Diagnóstico laboratorial

Devido a não especificidade do quadro clínico-laboratorial e da grande importância da ocorrência de hemoparasitose, vários testes diagnósticos têm sido propostos para a correta identificação deste patógeno (López et al., 2007; Aguirre et al., 2008; Jiménez et al., 2009; Kledmanel et al., 2009; Mylonakis et al., 2009; Ramos et al., 2009; Chandrashekar et al., 2010; Eshoo et al., 2010; Schotthoefer et al., 2013). Os diferentes testes por sua vez trazem grandes divergências em seus resultados (Aguirre et al., 2008; Scorpio et al., 2008; Hegarty et al., 2009; Santos et al., 2009; Vargas et al., 2012; Sousa et al., 2013; Tanikawa et al., 2013; Witter et al., 2013; Maggi et al., 2014) e averigua-se ainda a presença de reação cruzada entre os parasitos (Zanette et al., 2014).

A correta instituição terapêutica pode diferir entre os hemoparasitoses (Maggi et al., 2014), assim esta falta de concordância entre os testes pode acarretar em pacientes que sejam tratados sem necessidade (Hegarty et al., 2009) ou que estejam sendo tratados para patógenos os quais na realidade não sejam os reais agentes causadores da infecção.

Relata-se que em apenas 4% dos casos de hemoparasitoses observam-se a presença do parasito, sendo gasto um tempo médio de análise de 40 a 60 minutos dependendo da experiência do patologista (Harrus e Waner, 2011). Autores descrevem que cães com erliquiose podem apresentar falsos negativos quando se utiliza somente o exame direto como diagnóstico (Rotondano et al., 2012). Segundo Mylonakis et al. (2003) é possível a existência de um diagnóstico falso positivo por esta técnica, visto que a observação do parasito pode ser confundida com artefatos ou com estruturas celulares. No entanto, quando se comparou a identificação microscópica do parasita a PCR pode-se observar que esta última apresentou maior sensibilidade (Konglieng et al., 2014).

Testes sorológicos podem ser utilizados para a identificação de cães doentes, entretanto uma das desvantagens descrita por esta técnica é que como os anticorpos podem persistir circulantes por um determinado tempo mesmo a posteriori de terem sido debelados pelo cão, seja pelo tratamento ou de uma resposta imune efetiva (Preziosi e Cohn, 2002), estes testes não confirmam a existência da infecção ativa, somente verificam contato com o parasito (Preziosi e Cohn, 2002; Ravnik et al., 2011). Outra desvantagem é a possibilidade da existência de reação cruzada entre alguns patógenos (Da Costa et al., 2005; Zanette et al., 2014).

Recentemente, proteínas recombinantes têm sido propostas como forma de evitar que ocorra a existência de reações cruzadas entre os patógenos (Oliveira et al., 2015). Uma vantagem, no entanto é que esta técnica permite verificar infecções recentes, demonstrado pela soroconversão (Harrus e Waner, 2011). Testes diagnósticos mais modernos têm conseguido diminuir gradativamente o tempo de detecção de anticorpos contra peptídeos específicos do parasito, e apresentar positividade até 25 dias mais cedo que os testes anteriormente presentes no mercado (Moroff et al., 2014). Outra vantagem da sorologia é a possibilidade da detecção de infecções crônicas, quando um agente etiológico circula intravascularmente em níveis mais baixos da detecção da PCR ou quando este parasito é sequestrado para tecidos, os quais não são utilizados na avaliação da PCR rotineiramente (Miró et al., 2008; Paltrinieri et al., 2010).

Testes sorológicos mais específicos e sensíveis têm sido produzidos com o intuito de melhorar a qualidade dos exames, juntamente com o aumento da simplificação de seu manuseio, permitindo sua realização a campo sem a necessidade de equipamentos laboratoriais caros e sofisticados,

permitindo a obtenção dos resultados quase que imediatamente. Estes testes são conhecidos como “testes rápidos”, apresentando resultados semelhantes aos testes sorológicos tradicionalmente utilizados para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* (Davous et al., 2014). Alguns “testes rápidos” utilizam peptídeos espécie específicos e ainda são capazes de promover a detecção ao mesmo tempo de mais de um agente (Quorollo et al., 2014). Testes sorológicos com o emprego de peptídeos específicos também têm sido utilizados para determinar a soroprevalência de diferentes genótipos, permitindo assim a realização de uma melhor determinação da prevalência de diferentes cepas nas regiões do Brasil (Aguiar et al., 2016).

A técnica da PCR por detectar a presença do DNA do parasito apresenta como vantagens a capacidade de detectar em somente uma amostra a presença ativa da infecção, visto que determina a presença ou não do DNA ou RNA do patógeno (Little, 2010), pode ser utilizada para detectar mais de um agente com apenas uma amostra (Kledmanee et al., 2009; Peleg et al., 2010; Rufino et al., 2013); não existe a necessidade que o cão responda imunologicamente ao patógeno para que se determine a presença ou não da infecção (Little, 2010), outra vantagem da técnica é a possibilidade da detecção da carga parasitária no que se refere a PCR em Tempo Real – qPCR (Francino et al., 2006; Quaresmo et al., 2009) e desta forma pode-se concomitantemente acompanhar o efeito do tratamento (Andrade et al., 2011).

Em relação às desvantagens da PCR pode-se citar: a necessidade de um molde adequado de sequências de DNA ou RNA do patógeno que se deseja investigar (Harrus e Wanner, 2011); a possibilidade de falsos-negativos devido à ações inibidoras da reação pela presença de alguns agentes químicos utilizados na purificação do material genético da amostra ou a possibilidade de falsos positivos devido à contaminação laboratorial com o material genético do patógeno estudado (Maggi et al., 2014). Pode ocorrer falta de acordo entre os testes sorológicos e da PCR devido ao momento em que a amostra é colhida, do comportamento biológico dos patógenos e a variação da resposta imune do hospedeiro (Maggi et al., 2014).

Um trabalho cujo objetivo foi comparar a técnica da PCR com ensaios sorológicos (RIFI e ELISA) de cães com suspeita de infecção por agentes transmitidos por vetores descreve que do ponto de vista da demonstração da exposição ou identificação da infecção, o mais adequado é a junção dos resultados dos dois testes sorológicos, sendo realizados em paralelo com a PCR (Maggi et al., 2014). O diagnóstico conclusivo, para as doenças transmitidas por carrapato está na associação da avaliação clínica dos pacientes, somado aos resultados dos exames hematológicos e moleculares (Pinhanelli et al., 2015). O ideal no diagnóstico das hemoparasitoses é que o médico veterinário faça uma interpretação conjunta dos sinais clínicos, observação das alterações laboratoriais, resposta aos tratamentos associados aos resultados dos testes diagnósticos sorológicos e moleculares (Maggi et al., 2014).

Outros testes têm sido propostos para permitir que o diagnóstico da erliquiose canina seja mais apurado. Foi sugerida a utilização da técnica de amplificação isotérmica ampliada por ciclo-LAMP para a detecção de cães infectados, esta técnica quando comparada a PCR, apresentou ser mais efetiva que a última, pois foi capaz de identificar a presença do parasito em 54% das amostras avaliadas em detrimento de 36,5% detectados pela técnica da PCR (Pinhanelli et al., 2015).

2.3.6. Tratamento

Com relação ao tratamento da erliquiose, destaca-se a utilização das tetraciclinas e seus derivados. A doxiciclina é considerada por alguns autores como o fármaco de eleição (Harrus et al., 1998), porque atinge elevada concentração sanguínea e tecidual (Troy e Forrester, 1990). O tratamento mais preconizado é a utilização da doxiciclina, na dose de 10mg/kg, uma vez ao dia, por 28 dias (Neer et al., 2002; Fourie et al., 2015). Porém as pesquisas com este fármaco demonstram melhora dos sintomas clínicos juntamente com os aspectos hematológicos, no entanto, a eliminação do parasito foi controversa (Breitschwerdt et al., 1998; Harrus et al., 1998). É capaz de negativar a existência do parasito em cães com erliquiose na fase aguda e subaguda da doença, entretanto não foi efetivo em cães na fase crônica (McClure et al., 2010). A doxiciclina foi capaz de aumentar o número total de plaquetas, concentração de hemoglobina corpuscular média (HCM), α -globulinas, contagem absoluta de linfócitos B CD21+ e diminuir a concentração plasmática de creatinina tanto nos cães com erliquiose canina quanto no grupo controle não infectados, demonstrando um efeito adicional benéfico da doxiciclina não relacionada especificamente a sua ação antimicrobiana (Villaescusa et al., 2015).

Outro fármaco recomendado para o tratamento da erliquiose é o imidocarb. Este promove alterações morfo-funcionais do núcleo e citoplasma do parasito levando a sua destruição (Andrade e Santarém, 2002). Sua utilização é controversa, alguns estudos, no entanto, não demonstraram sua eficácia (Eddlestone et al., 2006). A rifampicina também já foi aventada como possibilidade no tratamento da erliquiose canina aguda, entretanto foi possível verificar a existência da recuperação hematológica dos cães infectados, mas não a promoção da eliminação completa do parasito (Theodouro et al., 2013).

2.3.7. Prevenção

Atualmente o controle do vetor transmissor da *E. canis* é que tem sido rotineiramente utilizado como método preventivo da doença. Diferentes modos de evitar a contaminação dos cães pela erliquiose têm sido propostos através do controle do carrapato marrom. Uma coleira contendo 10% de imidacloprida e 4.5% de flumetrina foi capaz de evitar a contaminação dos cães por mais de 375 dias quando desafiados com carrapatos infectados (Stanneck e Fourier, 2013). Outra estratégia utilizada para não permitir que o artrópode transmita a erliquiose para o cão é o uso de formulações tipo “por on”, que evitam a infestação dos animais pelo carrapato e, por conseguinte a exposição ao patógeno. Foi possível verificar a eficácia de algumas apresentações em mais de 96% por até quatro semanas pós-aplicação (Fourie et al., 2013).

Diferentes proteínas antigênicas da *E. canis* podem ser utilizadas para que se desenvolva uma vacina baseada em sua estrutura, entretanto ainda hoje não existe uma vacina contra o parasito disponível comercialmente (Thomas, 2016). Estirpes atenuadas do patógeno também têm sido propostas como opções para serem utilizadas em futuras produções de vacinas (Rudoler et al., 2012; Rudoler et al., 2015). Os primeiros resultados da utilização das cepas atenuadas de *E. canis* indicaram que nos grupos de cães que receberam estas estirpes quando desafiados com a estirpe selvagem, apresentaram menor parasitemia (Rudoler et al., 2012) e resposta inflamatória mais suave (Rudoler et al., 2015), demonstrando que a atenuação das *E. canis* futuramente podem ser utilizadas para a produção de vacinas contra o parasito (Rudoler et al., 2012).

Na Índia foi possível verificar o benefício da castração sobre a saúde dos cães, quando comparados aos animais não castrados. Observou-se que os cães castrados mesmo sem terem sido vacinados, ou tratados individualmente para doenças infecciosas, estes se apresentavam clinicamen-

te mais saudáveis e com menor taxa de infecção por *E. canis*, mesmo apresentando maior quantidade de carrapatos. Pode-se associar que a castração diminuiu a prevalência da erliquiose canina em cães de rua (Yoak et al., 2014).

2.4. *Hepatozoon canis*

Em 1905 foi descrita pela primeira vez a infecção em cães da cidade de Tezpur na Índia pelo *Hepatozoon canis* (*H. canis*), estes parasitos inicialmente foram denominados de “leucocytozoan”, pois foram observados em leucócitos de cães infectados (Bentley, 1905).

O *H. canis* tem o carrapato como seu hospedeiro definitivo e o cão como intermediário. Ao contrário do que ocorre com a maior parte dos protozoários, o *H. canis* é transmitido ao cão pela ingestão do artrópode vetor e não por sua infecção via picada (Baneth et al., 2007). O parasita passa para diferentes fases do desenvolvimento do carrapato devido sua transmissão transtadial (Giannelli et al., 2013).

Após a ingestão do carrapato pelo cão, os esporozoítas do *H. canis* são liberados no intestino e atravessam a parede infectando células mononucleares do sangue, disseminando-se tanto pela via sanguínea quanto por via linfática. Atingem órgãos como medula óssea, baço, pulmões, linfonodos e rins. Os merozoítas que se transformam em merontes pela divisão assexuada desenvolvem-se nos tecidos dos cães infectados. Observam-se dois tipos de merontes nos tecidos, conhecidos como micro e macromerozoítas. Após este processo os merontes são liberados já em sua forma madura, que por sua vez invadem leucócitos sanguíneos e se transformam em gamontes pelo processo de gamontogonia, e ainda os merontes, podem produzir merozoítas secundários nos tecidos. Pequenos cistos de *H. canis* formam-se nos tecidos dos animais infectados. Entretanto não se sabe de forma definitiva qual o papel destes cistos. O *H. canis* fecha seu ciclo, quando o artrópode definitivo faz o repasto sanguíneo em um cão infectado e ingerem neutrófilos e monócitos infectados (Baneth e Shkap, 2003).

Além da transmissão do parasita pela ingestão do carrapato, outra forma de infecção tem sido proposta, como a transplacentária da mãe doente para o filhote (Murata et al., 1993).

2.4.1. Epidemiologia

Existem duas espécies de *Hepatozoon sp.* capazes de infectar os cães. O *Hepatozoon canis* e o *Hepatozoon americanum* (Baneth et al., 2000), apesar de Gomes et al. (2016), descreverem pela primeira vez evidência molecular de *H. americanum* no país, o *H. canis* é tido como principal agente causador da infecção no Brasil (Forlano et al., 2007).

No Brasil já foram descritos diferentes carrapatos como *Amblyomma cajenese* (O’Dwyer et al., 2001), *Amblyomma ovale* (Forlano et al., 2005), *Rhipicephalus boophilus microplus* (De Miranda et al., 2011) e *Rhipicephalus sanguineus* (Gonçalves et al., 2014) infectados com *H. canis*.

A presença do parasita *H. canis* já foi descrita no Brasil nas regiões norte, nordeste, sul, sudeste e centro-oeste com prevalência variando de 1 a 77,39% (Mundim et al., 2008; Spolidorio et al.; 2011; Demoner et al.; 2016; Gomes et al., 2016; Harvey et al., 2016; Malheiros et al., 2016).

Em uma área endêmica para doença no Brasil, tentou-se evidenciar a existência de hospedeiros silvestres que pudessem servir como reservatório do agente em áreas rurais, entretanto ao se correlacionar o *Hepatozoon spp.* dos roedores avaliados, não foi possível encontrar uma correlação genética com os dos cães infectados nesta mesma região (Demoner et al., 2016).

Os fatores de riscos para a contaminação com o agente têm sido demonstrados no Brasil, principalmente no local da residência dos cães, sendo observada maior incidência da infecção nos animais de áreas rurais (Demoner et al., 2013). Ao que se refere a faixa etária e ao sexo não foi observado de modo geral predileção para a afecção (O'Dwyer, 2011), entretanto fatores de risco localmente observados demonstraram maior risco de infecção em cães machos, sem raça definida com menos de um ano de idade (Mundim et al., 2008).

2.4.2. Alterações clínicas e laboratoriais

É relatado que a maioria dos animais infectados com *H. canis* encontra-se sem a presença de sinais clínicos da doença, sendo classificados como assintomáticos (Kelly et al., 2013; Harvey et al., 2016). Porém dentre os animais que se encontram sintomáticos, pode ocorrer uma gama de alterações clínicas, como a presença de anorexia, mucosas pálidas, apatia, hipertermia, alterações pulmonares, prostração, diarreia, perda de peso, vômitos, poliúria, polidipsia (Gondim et al., 1998; Mundim et al., 2008; Chhabra et al., 2013), dores musculares, alterações neurológicas (Baker et al., 1988), glomerulonefrite e nefrite intersticial (Baneth e Weigler, 1997). Há relatos de alterações clínicas atípicas da doença, como presença de osteomielite (Marchetti et al., 2009; Shimokawa et al., 2011) e meningoencefalite (Marchetti et al., 2009).

Os cães que apresentaram maior número de leucócitos parasitados manifestaram sinais clínicos da doença com maior gravidade quando comparados aos cães com menor quantidade de leucócitos infectados (Klopfer et al., 1973).

Alterações ultrassonográficas foram correlacionadas à presença de diferentes hemoparasitos incluindo cães mono e co-infectados por *H. canis*, revelando que nestes cães é possível observar à diminuição da ecogenicidade hepática, distensão da vesícula biliar, presença de hepato-esplenomegalia e ascite, demonstrando claramente um comprometimento hepato-esplênico nestes animais (Sarma et al., 2016). Entretanto em cães parasitados no Brasil não foi observada presença de lesões na necropsia destes animais (O'Dwyer et al., 2004).

As alterações hematológicas mais comumente encontradas em cães com *H. canis* foram anemia normocítica normocrômica, leucocitose, neutrofilia com desvio nuclear a esquerda (Gondim et al., 1998; Mundim et al., 2008; Chhabra et al., 2013), linfopenia e monocitose (Gondim et al., 1998), entretanto outros autores descreveram a eosinofilia como sendo a alteração hematológica mais comumente encontrada (Otranto et al., 2011; De Tomasi et al., 2014), podendo estar associada a hipoplasia mielóide com aumento de componentes medulares precursores dos eosinófilos (De Tomasi et al., 2014). Outros autores, no entanto, ao avaliar as alterações hemáticas de cães infectados, não correlacionaram significativamente com nenhuma variação dos parâmetros hematológicos (Harvey et al., 2016). Foi observado no esfregaço sanguíneo que em coinfeções entre *H. canis* e *E. canis*, mais de 50% dos leucócitos apresentavam-se parasitados com ambos os patógenos, os autores sugeriram que a invasão por um parasita a uma célula leucocitária permite ou facilita a invasão e o prolongamento da sobrevivência do outro parasito (Baneth et al., 2015).

Alterações da bioquímica sérica de cães infectados demonstraram aumento da fosfatase alcalina, uréia, creatinina, hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipoglicemia, aumento da creatino quinase, e hipercalcemia (Marchetti et al., 2009; Sakuma et al., 2009; Kaur et al., 2012).

2.4.3. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da infecção pela observação do parasito em lâmina é comumente utilizado na rotina clínica, entretanto um estudo realizado no Brasil com o intuito de estabelecer a prevalência da doença, não observou a presença do parasita pela citoscopia em nenhum cão avaliado, enquanto 42,9% dos animais foram considerados positivos pela PCR (Harvey et al., 2016), demonstrando a melhor especificidade da última técnica no diagnóstico dos animais parasitados.

Estudos demonstraram que a PCR de sangue periférico ou de capa leucocitária são os melhores exames para identificação do patógeno (Sasanelli et al., 2010), entretanto se esta técnica não estiver disponível pode-se utilizar como alternativa a citoscopia da capa leucocitária (Otranto et al., 2011).

Técnicas de diagnóstico para a detecção de hemoparasitos têm sido propostas. Dentre elas as técnicas moleculares têm tido grande destaque por se mostrarem mais específicas, permitindo a identificação da presença ativa da infecção e não só a averiguação do contato com o patógeno. Entretanto estas técnicas são consideradas mais dispendiosas. Desta forma, recentemente foi proposto a utilização da Reação em cadeia da polimerase “fluorescence resonance energy transfer” em tempo real (qFRET-PCR) para a identificação de diferentes hemoparasitos ao mesmo tempo, com o intuito de diminuir os gastos com diferentes reações e por se tratar de uma técnica bastante confiável. Este exame foi utilizado na identificação da *B. canis vogeli* e *H. canis*, demonstrando 100% de especificidade (Kongklieng et al., 2015).

Técnicas sorológicas já foram descritas na tentativa de se obter a identificação de cães infectados, conseguindo detectar anticorpos dos cães parasitados por até sete meses pós-infecção (Gonen et al., 2004), porém estes testes não tem sido utilizados na rotina clínica (Greene, 2015).

2.4.4. Tratamento

Não existe um consenso sobre a instituição do tratamento de cães com hepatozoonose (De Tomasi et al., 2014) e desta forma diferentes protocolos quimioterápicos têm sido propostos com esta finalidade. Um estudo comparou a eficácia do dipropionato de imidocarb na dosagem de 5-6 mg uma vez por semana durante seis semanas e a associação do toltrazuril na dosagem de 15 mg uma vez ao dia por seis dias com a clindamicina 15 mg uma vez ao dia por 21 dias. Não foi observada diferença estatística em relação aos dois protocolos e em ambos, não foi observada cura parasitológica dos cães doentes (De Tomasi et al., 2014).

A associação entre o dipropionato de imidocarb e o toltrazuril foi testada com o intuito de melhorar a resposta clínica, laboratorial e parasitária da associação dos fármacos, entretanto não foi observada melhora em nenhum destes parâmetros nos cães infectados com *H. canis* (Pasa et al., 2011).

A associação entre clindamicina e sulfadiazina por 14 dias foi capaz de diminuir a quantidade de leucócitos parasitados, entretanto não ocorreu melhora nos sinais clínicos e laboratoriais dos animais tratados (Kaur et al., 2012).

O principal tratamento para infecção do *H. canis* é a utilização de dipropionato de imidocarb, entretanto mesmo a utilização deste fármaco não é capaz de eliminar o parasita completamente do organismo, mesmo sendo instituídas diferentes dosagem do fármaco e sua associação com doxiciclina (Sasanelli et al., 2010) desta forma novas drogas devem ser testadas para uma correta eliminação do parasita (Baneth, 2011).

2.4.5. Prevenção

A prevenção da hepatozoonose deve ser baseada em evitar que os cães ingiram os carrapatos vetores da doença (Baneth, 2011).

2.5. *Leishmania* sp.

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência mundial das diferentes formas clínicas de leishmaniose, zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, ultrapassa os 12 milhões de casos. Trata-se de uma doença endêmica nos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, com uma população de 350 milhões de habitantes residindo em áreas de risco. Na América latina a leishmaniose visceral (LV) já foi identificada em 12 países, ocorrendo relatos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com a maior parte dos casos ocorrendo no Brasil (Who, 2006).

O primeiro caso de leishmaniose visceral humana no Brasil (LVH) data de 1913 quando Migone descreve a necrópsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Corumbá - MS (Alencar, 1956). No último censo realizado no ano de 2014 sobre LVH no Brasil, verificou-se que entre os anos de 2010 e 2014 foram registrados 17.164 novos casos de LV e destes, 1.178 pessoas vieram a óbito (Brasil, 2016).

No Brasil a LV, também conhecida como calazar, é causada pela *Leishmania infantum chagasi*, e sua transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas de insetos dípteros da família Psychodidae (Gontijo e Melo, 2004). Estes flebotomíneos estão distribuídos por toda a América Latina, sendo popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui e tatuquira (São Paulo, 2007). O principal transmissor da doença é a *Lutzomyia longipalpis*, porém, a *Lutzomyia cruzi* já foi incriminada como transmissor deste protozoário no Estado do Mato Grosso do Sul (Santos et al., 2003).

As leishmanias são parasitos intracelulares de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) (São Paulo, 2007). Seu ciclo biológico inicia-se quando os flebotomíneos infectados com as formas promastigotas realizam o repasto sanguíneo. As formas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro, fagocitadas pelas células do SMF e, no interior dos macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas. Estas multiplicam-se por divisão binária intracelular até romperem os macrófagos e serem novamente fagocitadas. Desta forma, disseminam-se para órgãos linfoides tais como o fígado, baço, linfonodos e medula óssea, assim como para outras partes do organismo, por via linfática e hematogênica. Ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, o vetor ingere macrófagos parasitados que se romperão em seu intestino. As formas amastigotas são então liberadas, diferenciam-se em formas flageladas promastigotas, as quais originarão as formas infectantes. O ciclo evolutivo do parasito no vetor completa-se em torno de 72 horas (São Paulo, 2007; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os flebotomíneos realizam oviposição em ambiente sombreado e rico em matéria orgânica, e seu ciclo biológico, de ovo, larva, pupa a adulto, leva em torno de 30 dias para se completar (Morrison et al., 1993). A atividade hematofágica é realizada pelas fêmeas, predominantemente à noite, iniciando-se cerca de uma hora após o crepúsculo (Camargo-Neves et al., 2001). A vida média das fêmeas é de 20 dias (Morrison et al., 1993).

Apesar de alguns estudos aventarem a possibilidade da ocorrência da transmissão da leishmaniose visceral por meio de outros vetores invertebrados, como a *Ctenocephalides felis* (Ferreira et

al., 2009) e o *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho et al., 2005, Solano-Galleno et al., 2012; Viol et al., 2016) ainda não existe comprovação de tal fato. Porém foi comprovada a transmissão transtadial e transovariana até a terceira geração no carrapato vetor, onde foi comprovado que as fêmeas e as ninfas apresentam a maior taxa de infecção (Dabaghmanesh et al., 2016). No homem já foi reportada a transmissão da doença sem a necessidade de um vetor, como ocorre nos casos de transfusão sanguínea, ou pelo compartilhamento de agulhas contaminadas com sangue infectado (Pearson e Sousa, 1996) e em cães existem relatos da possibilidade da transmissão do parasito por meio de brigas (Naucke et al., 2016), além da transmissão transplacentária da mãe para os filhotes (Da Silva et al., 2009).

O quadro clínico nos cães é semelhante ao dos humanos, exceto pelo desenvolvimento de lesões de pele. Desta forma, a espécie canina assume singular papel como modelo experimental da doença no homem (Koutinas et al., 1992). Os cães podem apresentar sintomas inespecíficos, tais como febre, anemia, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia e perda progressiva de peso evoluindo para caquexia (Genaro, 1993; Baneth e Solano-Gallego, 2012). As lesões cutâneas são frequentes e apresentam padrões variados, que compreendem uma excessiva descamação da epiderme, áreas de alopecia, ulcerações e onicogribose (Feitosa et al., 2000). O período de incubação da doença no cão pode variar de três meses a dois anos (Genaro, 1993).

O diagnóstico clínico de cães com leishmaniose pode ser problemático visto que existe uma gama de sintomas não específicos levando a uma ampla variedade de apresentações (Blavier et al., 2001), além da elevada taxa de cães assintomáticos (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Foi observado que cães sintomáticos apresentam maior carga parasitária, quando comparados aos assintomáticos (Losada-Barragán et al., 2016). No Brasil a quantidade de cães assintomáticos encontra-se em torno de 40 a 60% dos animais infectados (Brasil, 2006).

A principal causa da morte de cães com a doença é a insuficiência renal, decorrente de quadros de glomerulonefrite e nefrite intersticial. Alguns cães apresentam alterações digestórias devido à presença de ulcerações na mucosa gástrica e intestinal. Podem-se verificar também diáteses hemorrágicas, tais como epistaxe, e alterações oftálmicas como ceratoconjuntivite, uveíte e alterações incomuns como glossite. Muitos cães desenvolvem problemas locomotores com manifestações clínicas decorrentes de poliartrite, polimiosite e até osteomielite (Noli, 1999; Feitosa et al., 2005; Alexandre-Pires, 2008; Baneth; Solano-Gallego, 2012; TANGALIDI et al., 2016).

Apesar de pouco frequente, existem relatos de alterações neurológicas em cães com leishmaniose visceral, com ou sem a participação de outros agentes oportunistas. Dentre elas destacam-se convulsões generalizadas, mioclonias, vocalização, anisocoria, midríase bilateral, nistagmo, lesão de nervos cranianos, inclinação da cabeça, andar em círculos, ataxia, tremor de intenção, tetraparesia e tetraplegia (Marcondes, 2008). Apesar desses relatos, a patogenia da doença no sistema nervoso não está totalmente esclarecida (Feitosa et al., 2000).

Após a inoculação de parasitos na pele, os macrófagos infectados agem como apresentadores de antígeno, estimulando preferencialmente linfócitos T auxiliares do subtipo Th1, que participam da resposta imune celular, ou Th2, que estimulam o desenvolvimento de resposta imune humoral (Lopez et al., 1996; Noli, 1999).

Quando ativadas, as células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α), as interleucinas IL-2, IL 6 e IL12 e o interferon gama (IFN- γ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres

são tóxicos para os parasitos, podendo levar ao controle do parasitismo, com eliminação da infecção. A IL-12, liberada no início do processo inflamatório, desempenha um papel crucial no controle da doença, já que influencia a resposta imune inata e a subsequente ativação de células TCD4⁺ do tipo Th1 (Pinelli et al., 1999; Weaver et al., 2007; Abbas et al., 2008).

Por outro lado, quando a infecção induz a uma resposta de linfócitos Th2, há síntese de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-13, bem como o fator de crescimento beta (TGF- β), com subsequente proliferação de linfócito B e produção de anticorpos (Martínez-Moreno et al., 1995; Santos-Gomes et al., 2002; Weaver et al., 2007). A produção de anticorpos, principalmente IgG, é elevada e promove mais danos do que proteção ao hospedeiro, devido à formação de grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que se depositam em vários órgãos e tecidos (Pinelli et al., 1999; Abbas et al., 2008).

Acredita-se que a resistência e a susceptibilidade à leishmaniose visceral possam ter bases genéticas, genes candidatos à promoção da susceptibilidade a doença tem sido propostos. O gene *Slc11c1* tem sido apontado como um promotor da produção da proteína transportadora de ferro, envolvida no controle da replicação intrafagossomal dos parasitos e na ativação dos macrófagos (Altet et al., 2002). Cães que apresentaram mutações neste gene eram mais susceptíveis a doença. Mutações neste gene são vistos em maior frequência em cães da raça boxer. Desta forma a maior susceptibilidade a doença nos cães desta raça foi correlacionada à presença de mutações genéticas (Sanchez-Robert et al., 2005).

2.5.1. Epidemiologia

A doença, que durante muitos anos se manifestava predominantemente em áreas rurais, nos últimos anos vêm se apresentando em áreas urbanas (Who, 2006; Jardim et al., 2014). Esta inversão é atribuída à grande migração da população rural para os subúrbios das áreas urbanas, levando à formação de locais densamente populosos, muitas vezes sem estrutura mínima de saneamento, criando assim um local propício para a proliferação do flebótomo. Nesses assentamentos, o parasito recém-introduzido encontra um grande número de indivíduos com baixa imunidade e desnutridos, mais vulneráveis a doença (Who, 2006). Recentemente um estudo avaliou a presença do vetor em áreas habitadas e em regiões de florestas do Brasil, foi possível verificar a maior presença do flebótomo parasitado em locais pertos de habitações humanas, o que reforça a afirmação que atualmente a transmissão do parasito ocorra mais comumente em áreas peridomiciliadas (Dorval et al., 2016).

A prevalência de leishmaniose visceral em cães em áreas endêmicas pode atingir de 20 a 40% da população. Acredita-se que em áreas com alta infecção em cães a incidência na população humana varie de 1 a 2% (Castro, 1996; Santa-Rosa, 1997; Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Foi demonstrada recentemente uma intensa expansão geográfica da leishmaniose em cães do Estado de Rio Janeiro, mesmo existindo ações rotineiras na tentativa de controle da afecção em regiões endêmicas do Estado. Porém infelizmente os estudos no estado tem demonstrado um aumento no número de casos de cães doentes (Silva et al., 2015) e o surgimento de novas regiões com a presença do agente, revelando o aumento de focos emergentes da doença no Brasil (D'Andrea et al., 2015).

2.5.2. Classificação da Leishmaniose canina

A classificação dos cães com leishmaniose adotada anteriormente baseava-se exclusivamente nos resultados do exame físico destes animais, que eram então classificados da seguinte forma: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos (Mancianti et al., 1988). Mais recentemente averiguou-se que esta classificação apresentava valor restrito, pois cães mesmo visualmente sem manifestações clínicas da doença apresentavam disfunções orgânicas ressaltadas através dos exames complementares (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Assim os exames complementares começaram a fazer parte da nova classificação dos cães com leishmaniose. Desta forma a classificação atualmente mais aceita é a seguinte: 1) Cães expostos – Estes animais não apresentam evidências de alterações clínico-patológicas, porém possuem sorologia positiva com titulação com até quatro vezes o valor de corte do exame. 2) Cães infectados – Não apresentam alterações clínico-patológicas, porém é demonstrado a presença do parasito, seja por métodos diretos, como a PCR, microscopia ou cultura parasitária, ou ainda pela utilização de métodos indiretos como a sorologia, quando os valores da titulação encontrados estejam à cima de quatro vezes o valor de corte do exame. 3) Cães doentes – São observadas alterações clínico-patológicas com associação da presença do parasito como descrito anteriormente. 4) Cães infectados clinicamente doentes – Observa-se evidências clínico-patológicas da doença com a demonstração do parasito, como anteriormente descrito. 5) Cães severamente doentes – Apresentam evidências clínico-patológicas severas da doença, como presença de nefropatia com proteinúria, insuficiência renal crônica, doença ocular grave, presença de doenças infecciosas, parasitárias, neoplásicas, endócrinas ou metabólicas concomitante, além das evidências laboratoriais da presença do parasito como descrito anteriormente (Solano-Gallego et al., 2009). Desta forma evidenciando a grande importância dos exames complementares para a atual classificação dos cães com leishmaniose.

2.5.3. Alterações laboratoriais

As alterações laboratoriais encontradas em cães com leishmaniose visceral são diversas, e fornecem subsídios para a avaliação do quadro clínico do animal e de seu prognóstico (Medeiros et al., 2008; Nicolato et al., 2013). O mielograma de cães infectados independente da apresentação clínica revela alta carga parasitária medular e presença das seguintes alterações: displasia megacariocítica, aplasia medular e presença multifocal a difusa de granulomas, afetando assim o perfil hematopoiético das células sanguíneas na circulação sistêmica (Momo et al., 2014). Em relação às alterações eritrocitárias dos cães com leishmaniose observa-se que de 50% a 70% dos animais podem apresentar anemia, a qual tem como principais características ser normocítica normocrômica (Medeiros et al., 2008; Solano-Gallego e Baneth, 2012) e arregenerativa (Solano-Gallego e Baneth, 2012). Foi demonstrado através de um estudo que avaliou o mielograma de cães com leishmaniose a presença de menor quantidade de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos e menor contagem de células das linhagens finais eritropoiéticas como os eritroblastos ortocromáticos. Este estudo conseguiu relacionar que os cães que apresentavam diminuição de contagem da série eritroblástica na medula, também apresentavam níveis mais baixos de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (Nicolato et al., 2013).

Outros mecanismos para a apresentação da anemia em cães com leishmaniose também foram propostos, como a diminuição da eritropoiese devido ao caráter crônico da doença, perda sanguínea (Ikeda-Garcia et al., 2003; Solano-Gallego e Baneth, 2012), diminuição eritrocitária devido a produção de anticorpos autoimunes ou pela doença renal crônica (Solano-Gallego e Baneth, 2012). Anemias graves foram correlacionadas aos cães que se apresentavam clinicamente

sintomáticos (Reis et al., 2006) e aos animais com maior carga parasitária (Guerra et al., 2008). A presença da anemia juntamente com a trombocitopenia parecem ser as primeiras alterações clínico-laboratoriais a ser manifestada por cães com leishmaniose (Manzillo et al., 2013).

Em relação às alterações da linhagem de células brancas em cães com leishmaniose, observa-se uma controvérsia entre os resultados encontrados em diferentes trabalhos, que demonstram a presença de leucocitose (Aguiar et al., 2007; Freitas et al., 2012; Sonoda et al., 2013), leucopenia (Ikeda-Guarcia et al., 2003; Da Silva et al., 2011; Nicolato et al., 2013) ou de resultados muito próximos entre leucocitose e leucopenia (Medeiros et al., 2008). Em relação aos linfócitos é observado de igual forma uma divergência de resultados entre os pacientes caninos com leishmaniose, obtendo-se resultados de leucocitose (Ikeda-Guarcia et al., 2003; Abreu-Silva et al., 2008) a linfopenia (Ikeda-Guarcia et al., 2003; Medeiros et al., 2008) ou ainda apresentação de linfocitose/linfopenia dependendo da fase clínica que este paciente se encontra, onde cães assintomáticos apresentaram-se com linfocitose e cães sintomáticos com linfopenia (Reis et al., 2008; Nicolato et al., 2013). Níveis mais elevados de linfócitos CD8 foram relacionados a pacientes que apresentavam menor parasitismo esplênico e apresentação fenotípica assintomática, demonstrando uma resposta eficaz (Reis et al., 2006). Foram observadas presença de neutrofilia em cães com *Leishmania sp.*, e em alguns casos esta alteração foi associada à presença de infecções concomitantes (Ikeda-Guarcia et al., 2003), em outros relatos porém foi observado a presença de um incremento nas precursoras da linhagem de células neutrofílicas no mielograma destes cães, culminando no aumento de neutrófilos maduros na circulação sistêmica, relacionado principalmente a pacientes que apresentavam maior carga parasitária (Tróia De Abreu et al., 2011; Nicolato et al., 2013).

A eosinofilia (Medeiros et al., 2008) e eosinopenia (Reis et al., 2006; Guerra et al., 2008) já foram relatadas em cães com *Leishmania sp.* porém esta última alteração foi correlacionada a diminuição das células precursoras de eosinófilos no mielograma destes pacientes, sendo associada a cães que apresentavam sinais clínicos da doença e alta carga parasitária (Tróia De Abreu et al., 2011; Nicolato et al., 2013). A Monocitose (Medeiros et al., 2008) e a monocitopenia (Reis et al., 2006; Guerra et al., 2008) foram evidenciadas em cães com leishmaniose, porém esta última foi associada a cães com alta parasitemia (Reis et al., 2006; Guerra et al., 2008; Nicolato et al., 2013).

Em suma às alterações das linhagens eritróides e leucocíticas em cães com leishmaniose são diversas, porém os pacientes que possuam a associação entre anemia e leucopenia devido à eosinopenia, monocitopenia ou linfopenia parecem apresentar quadros mais severos da doença (Nicolato et al., 2013). Demonstrando que o hemograma apresenta-se como um subsídio muito importante na avaliação da resposta do cão frente à infecção (Ikeda-Garcia et al., 2003). A trombocitopenia também é relatada frequentemente como achado laboratorial em animais com leishmaniose (Medeiros et al., 2008), sendo uma das primeiras alterações a serem encontradas em cães com *Leishmania sp.* (Manzillo et al., 2013). Acredita-se que a trombocitopenia possa ocorrer devido a reações imunomediadas (Cortese et al., 2009) ou pela displasia megacariocítica presente nestes cães devido a infecção (Manzillo et al., 2006).

Na leishmaniose canina, diferentes alterações bioquímicas são relatadas, dentre elas destacam-se: presença de hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Ciaramella et al., 1997; Almeida et al., 2005; Reis et al., 2006; Castro et al., 2012; Manzillo et al., 2013; Costa et al., 2015), estas alterações estão relacionadas ao aumento da concentração plasmática das frações β e γ que seriam

as responsáveis pelo aumento global das globulinas, e no que se refere a hipoalbuminemia está relacionada a perda na urina devido a nefropatia, doenças hepáticas, subnutrição ou por combinações destas (Amusatogui et al., 2003). Observa-se que a relação albumina/globulina(A/G) encontra-se diminuída em cães fenotipicamente oligossintomáticos e esta relação é encontrada com valores ainda menores em cães fenotipicamente sintomáticos (Reis et al., 2006; Giunchetti et al., 2008).

As enzimas hepáticas que mais comumente encontram-se aumentadas são a alanino aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) (Abreu-Silva et al., 2008). É descrito que em 16% dos cães com leishmaniose pode ocorrer o aumento das enzimas hepáticas (Ciaramella et al., 1997). Outros estudos, no entanto não evidenciaram alterações nas enzimas hepáticas de cães com leishmaniose (Castro et al., 2012) e outros autores descrevem que alterações das enzimas hepáticas de cães com leishmaniose não são frequentes (Amusatogui et al., 2003).

Os aumentos séricos de ureia e creatinina em cães com leishmaniose é um achado comum, sendo encontrado em 45% destes animais (Amusatogui et al., 2003). Cães filhotes experimentalmente infectados com *Leishmania sp.* demonstraram que o aumento sérico da ureia e/ou da creatinina ocorrem na fase mais tardia da doença (Manzillo et al., 2013), porém outro trabalho evidenciou um aumento precoce da ureia e creatinina em cães naturalmente infectados logo após a soroconversão, indicando que alterações na função renal ocorre em um período curto pós infecção (Alves et al., 2013).

Torrecilha et al., (2016) demonstraram recentemente que a carga parasitária dos cães infectados está correlacionada com a severidade das alterações físicas e laboratoriais. Estes autores sugeriram que os exames laboratoriais utilizados na rotina clínica tem alto valor preditivo em relação à intensidade da infecção periférica, o que demonstraria que os cães com os valores laboratoriais alterados teriam maior capacidade de transmitir o parasito.

2.5.4. Diagnóstico laboratorial

Os exames complementares possuem restrições em relação ao diagnóstico da leishmaniose canina. A identificação parasitológica tem caráter limitado devido a sua baixa sensibilidade, por requerer repetidas amostragens de tecidos e ainda exigir técnicos de laboratório experientes para sua análise, além de ser muito invasiva demorada e laboriosa. Desta forma é considerado um teste inapropriado para a detecção de cães com leishmaniose (Quaresma et al., 2009).

Os exames sorológicos por sua vez também possuem restrições quanto a sua utilização. Visto que os exames sorológicos utilizados como método de triagem – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA e confirmatório – Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI pelo Ministério da Saúde do Brasil até o ano de 2011 (Brasil, 2012), apresentaram uma menor taxa de identificação de cães com leishmaniose, 6,2% da população estudada, quando comparada ao novo teste de triagem indicado pelo Ministério da Saúde do Brasil a partir de 2012 – DPP (Dual-Path Platform) associado ao teste confirmatório – ELISA, demonstrando a presença de 8,1% de cães infectados com *Leishmania sp.* na mesma população. Evidenciando uma possível falha na identificação de cães com leishmaniose visceral durante vários anos, nos quais os primeiros testes eram recomendados, permitindo assim que uma parcela dos cães infectados não fosse corretamente identificada (Coura – Vital et al., 2014).

Recentemente foi novamente avaliada a eficácia do protocolo de triagem com DPP e confirmatório com ELISA (atualmente indicado como método de diagnóstico de cães com leishmaniose)

frente ao protocolo anterior, que como teste de triagem utilizava o ELISA e confirmatório pelo teste da RIFI, confirmando a melhor eficácia do teste protocolo apresentando maior especificidade (Fraga et al., 2016).

Alguns testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose demonstraram presença de reação cruzada com diferentes patógenos como *E. canis* (Oliveira et al., 2008; Zanette et al., 2014), *Trypanosoma cruzi* (Alves et al., 2012; Zanette et al., 2014), *Toxoplasma gondii* (Zanette et al., 2014), *Babesia canis* (Oliveira et al., 2008; Zanette et al., 2014; Laurenti et al., 2014) e *Neospora canis* (Zanette et al., 2014). Além disto, os testes sorológicos podem falhar em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, cães que nunca farão soroconversão, e cães que se convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados (Feitosa et al., 2000; Ikeda et al., 2006).

Outros autores descrevem a não existência de reação cruzada da *L. chagasi* entre a *E. canis* e *B. canis vogeli*, e sim que ocorre a coinfeção entre estes patógenos (Oliveira et al., 2008; Krawczak et al., 2015).

A ocorrência de reação cruzada nos testes sorológicos é controversa, havendo trabalhos que a confirmam e outros que a negam, entretanto, todos os trabalhos acerca de técnicas sorológicas na detecção da leishmaniose visceral demonstram um significativo percentual de falsos positivos principalmente para as técnicas de ELISA e RIFI, mas também foi evidenciada a mesma falha nos testes atualmente preconizados de imunocromatografia (Barbosa-De-Deus et al., 2002; Ferreira et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Grimaldi et al., 2012; Ker et al., 2013; Krawczak et al., 2015).

A discordância entre os trabalhos pode ocorrer devido à variedade de técnicas e antígenos empregados nos testes, alguns fazem uso de antígenos brutos de *Leishmania sp.*, enquanto outros utilizam amostras purificadas, contendo antígenos específicos de *L. chagasi*, denominados testes de ELISA homólogos. A variação na especificidade se explicaria porque na utilização de antígenos brutos existem proteínas comuns a diferentes leishmanias, algumas não visceralizantes, e até mesmo comuns a outros hemoparasitos. Por outro lado, a utilização de testes com antígenos homólogos poderia haver prejuízo à sensibilidade (Barbosa-De-Deus et al., 2002; Mettler et al., 2005; Alves et al., 2012; Da Silva et al., 2013).

Em diversos trabalhos os testes imunocromatográficos utilizando antígenos rK26 e rK39 se mostraram mais específicos que os testes sorológicos de ELISA, RIFI e o teste de aglutinação direta (DAT) (Grimaldi et al., 2012; Da Silva et al., 2013; Ker et al., 2013; Krawczak et al., 2015). Entretanto, há um significativo percentual de falsos negativos, questão resolvida quando é aplicado na mesma população um teste amplo, com grande sensibilidade, como o teste ELISA (Quinnel et al., 2013). Outro fator a favor dessa técnica é a agilidade nos resultados, que são obtidos em minutos após a coleta do sangue, tornando esse teste ideal para os programas de controle da doença, pois permite que se tome a medida adequada no momento do diagnóstico positivo (Quinnel et al., 2013).

Técnicas moleculares também podem ser utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral. A PCR permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, aspirados de linfonodos, baço, fígado, biópsias cutâneas, conjuntiva, sangue, liquor e em cortes de tecidos parafinados e congelados (Solano-Gallego et al., 2009; Quaresma et al., 2009; Maia et al., 2009; Nunes et al., 2007; Lombardo et al., 2012;

Colombo et al., 2015; Silva et al., 2016). Nesta técnica, existe uma ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis para o diagnóstico molecular da leishmaniose, o que dificulta a inserção da técnica na rotina dos serviços de saúde. Sendo assim ainda não existe um procedimento padrão ouro para o diagnóstico de *Leishmania sp.* Desta forma para o correto diagnóstico da leishmaniose, o ideal é que ocorra uma junção da PCR com os demais testes diagnósticos a fim de aumentar a sensibilidade e diminuir possíveis resultados errôneos em relação ao diagnóstico da afecção (Cakan et al., 2010).

2.5.5. Prevenção

Diferentes coleiras repelentes têm sido utilizadas com o objetivo de impedir que cães sejam picados por vetores capazes de transmitir a doença. Recentemente foi demonstrado que uma coleira impregnada com 10% de imidacloprida + 4.5% de flumetrina permitiu que somente 5,5% dos animais estudados se infectassem com *L. chagasi*, quando desafiados em área endêmica, demonstrando a necessidade da utilização de repelentes no auxílio ao combate da doença (Brianti et al., 2016). A associação entre diferentes tipos de repelentes do flebotomínio mostrou-se eficaz em diminuir o número de cães infectados em área endêmica, quando comparados aos animais que utilizaram somente um método de controle contra o vetor (Goyena et al., 2016).

As vacinas no mercado tem demonstrado diminuição de mais de 70% da parasitemia esplênica de cães que mesmos vacinados ainda se infectam, demonstrando que mesmo os animais que se tornam portador da doença, a mantêm com menor carga parasitária (Resende et al., 2016).

2.6. Lesões renais em decorrência de infecções transmitidas por vetores

Lesões renais em humanos e em animais, tem sido descritas em consequência das infecções por hemoparasitos, como o caso de glomerulonefrites em pacientes humanos com doença de Lyme (McCausland et al., 2011; Rolla et al., 2013), acarretando lesão renal grave, levando o paciente a realização de diálise por meses, até sua total recuperação (Kirmizis et al., 2004), nos cães a *Borrelia burgdorferi* (agente causador da doença de Lyme) acarreta glomerulonefrite membranoproliferativa imuno-mediada, quase sempre fatal (Dambach et al., 1997).

Outro agente infeccioso capaz de induzir lesões renais graves é a *Leishmania infantum chagasi*, onde 92% dos cães, cujos rins foram avaliados, apresentaram glomerulonefrite membranoproliferativa, sendo que em 8% destes animais foi possível detectar a presença de amastigotas, por meio da imunohistoquímica (Dos Santos et al., 2013). Foi observado que mesmo com soroconversão recente, os cães infectados já demonstravam lesões glomerulares, estas alterações renais encontravam-se presentes mesmo na fase inicial da infecção, mesmo sem o aumento de ureia e creatinina (Alves et al., 2013). A principal causa de óbito nos cães com leishmaniose visceral é a nefrite proteinúrica crônica, que em sua fase final evolui para síndrome nefrótica, associada ou não a hipertensão arterial sistêmica (Koutinas e Koutinas, 2014).

Cães experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis* apresentaram vasculite renal e glomerulonefrite, com infiltrados de células mononucleares na fase aguda da doença (De Castro et al., 2004) e proteinúria (Codner et al., 1992). Nas fases subclínica e crônica da erliquiose monocítica ocorre estímulo constante do sistema imune, desencadeando glomerulonefrite induzida por deposição de imunocomplexos, com alterações renais silenciosas que evoluem para doença renal terminal (Silva et al., 2015).

Depósitos multifocais de IGM foram demonstrados por imunohistoquímica nas artérias inflamadas e glomérulos renais, em consequência da intensa imunoestimulação em cães com babesiose (Wozniak et al., 1997). A babesiose canina pode culminar em morte, decorrente das consequências da lesão renal aguda, mesmo após a correta instituição do tratamento (Camacho et al., 2002). Oito cães que foram a óbito devido a complicações de *Babesia canis* demonstraram presença de degeneração hidrópica e necrose em células tubulares renais, em alguns cães foi possível observar a presença de necrose em todos os túbulos renais (Máthé et al., 2007). Outra espécie de babésia que pode levar a lesão renal é a *Babesia gibsoni* que pode culminar em proteinúria, devido à doença glomerular imunomediada (Slade et al., 2011).

Lesão renal grave também já foi reportada em humanos infectados com *Babesia sp.*, promovendo lesão tubular e nefrite intersticial aguda. Sendo observada nestes pacientes presença de eritrócitos parasitados pela *Babesia sp.* na sedimentoscopia urinária (Luciano et al., 2013).

As principais lesões encontradas nos rins de cães infectados por *Hepatozoon canis* foram amiloidose, nefrite e glomerulonefrite intersticial (Macintire et al., 1997). Sendo possível observar a presença de esquizontes nos rins, desencadeando a lesão renal (Baneth e Weigler, 1997).

Devido a grande correlação entre doenças infecciosas e lesões renais, segundo Goldstein et al. (2013), quando um cão apresentar evidências clínicas de doenças infecciosas associada à presença de proteinúria, deve-se suspeitar imediatamente que uma doença glomerular pode encontra-se ativa. Desta forma, assim que o paciente tenha sido diagnosticado com um agente infeccioso em associação a uma doença glomerular, o tratamento deve ser instituído o mais breve possível, tanto contra o agente, quanto para a proteinúria, pois cães com proteinúria mesmo com ausência de azotemia, pode desenvolver doença renal progressiva associada à infecção, com consequências potencialmente graves podendo culminar em doença renal crônica.

A doença renal crônica ocorre quando alterações funcionais ou estruturais encontram-se presente nos rins por mais de três meses, tendo como causas base diferentes distúrbios. Como a doença renal crônica encontra-se instalada por um período de tempo longo, é considerada como uma doença progressiva e sem cura (Polzin, 2011).

A identificação da doença renal crônica baseia-se inicialmente nos valores séricos de creatinina, que ainda hoje são considerados o diagnóstico padrão ouro para a doença. A mais nova classificação da doença renal crônica de cães está embasada nas instruções da Sociedade Internacional de Interesse Renal (Iris, 2015) que subdividem a doença em diferentes estágios. Secundariamente ao estadiamento, estes estágios são subdivididos de acordo com o grau de proteinúria e presença arterial sistêmica dos cães.

O aumento da creatinina ocorre de forma tardia, ou seja, quando 66 a 75% dos néfrons demonstram incapacidade funcional, como descrito por Freitas et al. (2014), não sendo um bom indicador de lesão renal precoce. Os mecanismos da progressão da doença renal crônica ainda permanecem desconhecidos, pois não se sabe ao certo se lesões ativas esporádicas levam a danos cumulativos, ou se estresses permanentes culminam em lesões renais terminais com perda da massa renal funcional (Cowgill et al., 2016).

Novos biomarcadores de soro e urina estão sendo avaliados em humanos e animais na tentativa de melhorar a capacidade de diagnosticar com precisão as doenças renais agudas e crônicas incluindo o potencial para a detecção precoce da injúria. Além disso, estes biomarcadores ajudam

a identificar os vários processos que levam a doença renal, tais como, dano glomerular ou disfunção tubular (Cobrin et al., 2013).

Desta forma o estudo de novos biomarcadores que predizem o início precoce da lesão renal, têm sido pesquisado com grande interesse (Cowgill et al., 2016), na última década, o campo emergente da proteômica clínica revigora a esperança de identificar novos biomarcadores no plasma e urina para caracterizar causa e curso de lesão renal (Siew et al., 2011). A demanda por testes e marcadores para detectar estágios iniciais da injúria renal, vem impulsionando o estudo de novas ferramentas diagnósticas. Na medicina, a aplicação experimental de biomarcadores já é realidade, mas, na medicina veterinária o alto custo dos ensaios, carência de reagentes espécie-específicos representam grandes entraves. Alguns biomarcadores renais como N-acetil-beta-D-glicosaminidase (NAG), γ -glutamyl-transpeptidase urinária (GGTU), Fosfatase alcalina urinária (FAu) e Cistatina C, já vem sendo estudados na medicina veterinária, assim como a detecção de proteínas de baixo peso molecular na urina, como a microalbuminúria indicando dano tubular renal (Castro et al., 2016) e segundo Freitas et al. (2014) a identificação de proteinúria nos cães é considerada como um marcador precoce da lesão renal aguda, sendo de fácil mensuração e realização.

Proteinúria recorrente tem sido fortemente associada a riscos de progressão da lesão renal nos animais. A evidência de proteína sendo excretada na urina está correlacionada com doença renal crônica progressiva em cães e gatos (Cowgill et al., 2016). E ainda, a presença de proteinúria pode ser a primeira alteração detectada em doenças genéticas renais familiares, demonstrando que a identificação da proteína na urina, pode ser um marcador precoce de lesão renal. (Lees et al., 1998; Lavoué et al., 2015).

Um biomarcador utilizado na medicina veterinária é a mensuração da atividade urinária da gama glutamiltransferase (GGTU), uma enzima produzida pelo epitélio tubular renal tendo como função promover a desintoxicação das células renais, operar nos processos de biossíntese de leucotrienos e ainda promover o biotransporte de aminoácidos renais (Castonguay et al., 2003). Sua presença na urina indica lesão renal, pois a GGT sérica possui peso molecular muito alto para ser filtrada pelo glomérulo. A presença da enzima na urina demonstra uma lesão tubular aguda de forma precoce, e sua detecção na urina ocorre antes de evidências de azotemia nos cães (Thrall et al., 2012).

Foi utilizada a mensuração da GGT em células renais, *in vitro*, como parâmetro para identificar a presença de toxicidade renal precoce, durante a utilização de gentamicina. Esta enzima foi capaz de evidenciar a presença de lesão tubular proximal, demonstrando que a nefrotoxicidade foi dose dependente, e quando mensurada *in vivo* foi capaz de demonstrar a toxicidade renal, acompanhado de o retorno a normalidade, após a suspensão da utilização do fármaco (Van Der Harts et al., 2005).

Sabe-se que a densidade urinária (DEU) é a medida da concentração da urina. Entretanto, diversas variáveis podem alterar seus valores, sendo a presença de solutos um deles. Desta forma sua variação pode alterar os valores do GGT na urina. Devido a este fato Deschepper et al. (1989) propuseram uma fórmula de correção, para evitar a interferência da variação da DEU, podendo ser utilizada em uma única amostra de urina, permitindo que deste modo exista uma padronização dos resultados.

Sabe-se que a análise da função renal pode ser avaliada pelos níveis da GGT urinária (Amaral, 2016), e pela relação entre gama glutamiltransferase e creatinina (GGTU/CrU), pois embora a atividade da concentração, tanto da GGT como da creatinina na urina, apresentaram variação isoladamente, sua proporção permaneceu constante em equinos (Adam et al.; 1985) e em cães saudáveis (Rivers et al., 1997) pois, a quantidade de creatinina produzida é dependente da massa muscular e não apresenta grandes variações diárias (Sodré et al.; 2007). Desta forma quando os valores desta relação encontram-se elevados pode identificar lesão tubular, com consequente proteinúria (Ibba et al., 2016). Os valores da GGTU em cães normais estão entre 13 a 92U/L (Deschepper et al., 1989) e da relação GGTU/CrU é de $0,14 \pm 0,10$ em cães adultos (gossett et al., 1997).

As fosfatases alcalinas (FA) são proteínas estruturais, que inclui expressões constitutivas e atuam como enzimas em organelas intracelulares, quando o rim sofre injúria, são liberadas na urina. É uma das enzimas com problema na sua implantação, pois funcionam de forma diferente em pacientes distintos, principalmente com múltiplas comorbidades, pois provavelmente sua expressão não é específica para o rim e em uma disfunção renal as suas propriedades analíticas podem variar com o tipo de insulto (Konvalinka, 2014).

Em relação à GGT e a FA urinária, não há diferença em relação a sexo ou idade e atividade física, da mesma forma não houve relação com variação destas mesmas enzimas no soro (Brobst et al., 1986). A relação de GGT/creatinina na urina parece superior como indicador precoce de nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos (Rivers et al., 1996), da mesma forma que a relação proteína/creatinina urinárias (UPC), são métodos efetivos para detectar alterações da função renal (Amaral, 2016).

A Associação Internacional de Interesse Renal (IRIS) estabelece subestadiamento de lesão renal crônica baseado nos valores de proteinúria, onde cães com a relação proteína/creatinina urinária (UPC) menores que 0,2 são considerados não proteinúricos, entre 0,2 e 0,5 são considerados limítrofes e apresentam microalbuminúria, e quanto a UPC for maior que 0,5 o cão é considerado proteinúrico, ou seja, está liberando quantidade significativa de proteína pela urina. A importância da microalbuminúria na previsão da saúde, ainda não é entendida. Além da proteinúria, a IRIS considera que a verificação da pressão sanguínea arterial é um importante parâmetro a ser avaliado, com o intuito de se prevenir um futuro dano renal (Iris, 2015).

Os cálculos da UPC em amostras aleatórias de urina de cães se equivalem à perda de proteína no período de 24 horas (Grauer et al., 1985). A utilização da relação da proteína e creatinina urinária, em substituição à determinação de proteinúria de 24 horas, para acompanhamento de doenças glomerulares, além de serem confiáveis, apresentam vantagens pela maior facilidade na coleta e o menor custo (Solorzano et al., 2012)

A quantificação das enzimas, proteínas, e ainda a observação da sedimentoscopia urinária têm grande valor como exames sensíveis na detecção da injúria renal precoce. Desta forma podem ser utilizados como testes que além de auxiliar na detecção da identificação precoce renal, demonstram a eficácia do tratamento (Freitas et al., 2014).

2.7. Síndrome do eutireoideo doente em cães com hemoparasitose

Na fisiologia da tireoide, a glândula é estimulada a produzir os hormônios Tiroxina (T4), Triiodotironina (T3) e Triiodotironina reversa (T3r) pela ação do hormônio estimulante da tireoide (TSH). Quando ocorre a liberação dos hormônios na circulação sanguínea o T4 se liga a proteí-

nas plasmáticas onde mais de 99% deste encontra-se sob esta forma no plasma, ou seja, ligado a proteínas mantendo-se como forma de reserva. A outra parte do hormônio não ligada é denominada de T4 livre. É este hormônio na forma livre que atua como feedback negativo sobre a secreção de TSH pela hipófise. Ao entrar nas células do organismo o T4 livre é desiodado e transforma-se em T3 ou T3r, onde este último é considerado como uma forma não ativa do hormônio T3. O hormônio T3 intracelular é que possui a capacidade de produzir efeitos fisiológicos no organismo (Nelson, 2015).

Os hormônios T4 e T3 têm efeitos sobre o metabolismo celular e sua deficiência desencadeia diversos sinais clínicos (Finora e Greco, 2007). Para que o cão apresente sinais clínicos compatíveis com hipotireoidismo é necessário que mais de 75% da glândula seja destruída (Nelson, 2015).

Doenças extras tireoidianas podem levar a diminuição dos hormônios séricos acarretando em uma síndrome conhecida como “Síndrome do eutireoideo doente-SED”, sendo considerada por alguns autores como um mecanismo de economia de energia em situações de estresse (Henne-man e Krenning, 2007).

Esta síndrome pode ocorrer devido a diferentes respostas do organismo frente às doenças existentes, como o declínio da secreção do TSH devido à supressão da hipófise e/ou hipotálamo, diminuição da síntese ou concentração de T4 pela diminuição da afinidade com proteínas séricas de ligação, maior excreção de T4 devido a um aumento na metabolização e excreção hepática do hormônio (Nelson, 2015). Em relação à diminuição do T3, este fato pode ocorrer como resultado da transformação diminuída de T4 em T3 nas células culminando em baixas concentrações plasmáticas de T3. Em cães com SED foi descrito que a presença da IL-6, uma interleucina pró-inflamatória tem correlação inversa com valores séricos de T3 (Zygner et al., 2015).

A SED já foi descrita em cães acometidos por diferentes doenças como: choque hemorrágico (Shigematsu e Shatney, 1988), epilepsia (Von Klopman et al., 2006), síndrome da resposta inflamatória, septicemia (Pashmakova et al., 2014), doenças gastrointestinais e neoplasias (Mooney et al., 2008). Entretanto nem todas as doenças graves são capazes de acometer o cão com SED, como demonstrado em cães com poliartrite severa (Paradis et al., 2003).

A presença da síndrome do eutireoideo doente tem sido relacionada com a severidade da doença, onde as concentrações séricas reduzidas dos hormônios tireoidianos têm sido correlacionadas a maus prognósticos (Mooney et al., 2008). A diminuição de hormônios tireoidianos também pôde ser observada após a utilização de fármacos como sulfonamidas, levando a manifestações clínicas severas como depressão do sistema nervoso central (Brenner et al., 2009).

Mais recentemente a SED tem sido descrita por autores como uma afecção que acomete os animais mais comumente do que anteriormente se tinha ciência (Mooney et al., 2008), sendo observada em doenças parasitárias como em casos de infecção por *Babesia rossi* (Schoeman et al., 2007), *Babesia canis* (Zygner et al., 2015), *Ehrlichia canis* mono ou co-infectada com *Babesia gibsoni* (Kumar et al., 2006) e *Leishmania chagasi* (Scharidomichelakis et al., 2013).

Nas doenças transmitidas por vetores se observa uma vasta resposta do organismo em referência à modulação dos hormônios tireoidianos, como a presença de baixos níveis de T3 em infecções com *B. canis* e *E. canis* (Kumar et al., 2006; Schoeman et al., 2007; Scharidomichelakis et al., 2013; Zygner et al., 2015) de T4 total em *B. canis*, *B. rossi*, *E. canis* e *L. chagasi*, (Kumar et al., 2006; Schoeman et al., 2007; Scharidomichelakis et al., 2013; Zygner et al., 2015) de T4 livre

em cães com *B. canis*, *B. rossi* e *L. chagasi* (Schoeman et al., 2007; Scharidomichelakis et al., 2013; Zygner et al., 2015). Com exceção da infecção por *B. canis* em cães (Zygner et al., 2015) os demais parasitos descritos parecem não levar a diminuição dos valores séricos de TSH.

Um estudo recente realizado no Brasil avaliou cães infectados com *E. canis* e não demonstrou a ocorrência da SED nos animais estudados, onde estes mantiveram os valores de T4 livre, T4 total e TSH dentro dos valores de normalidade (Rondelli, 2015).

A instituição do tratamento para a SED não deve ser baseada na utilização da levotiroxina, fármaco utilizado para cães com hipotireoidismo. O tratamento deve ser voltado para causa base da doença existente, onde após a eliminação da enfermidade, os níveis de hormônios tireoidianos retornarão aos valores de normalidade (Nelson, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos animais

Foram incluídos no estudo dois grupos de cães. O primeiro grupo foi composto por 24 animais, independente de raça e sexo, com mais de um ano de idade, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo – ES que apresentavam pelo menos três alterações clínicas e/ou laboratoriais compatíveis com hemoparasitoses (Figura 1) (Neer et al., 2002).

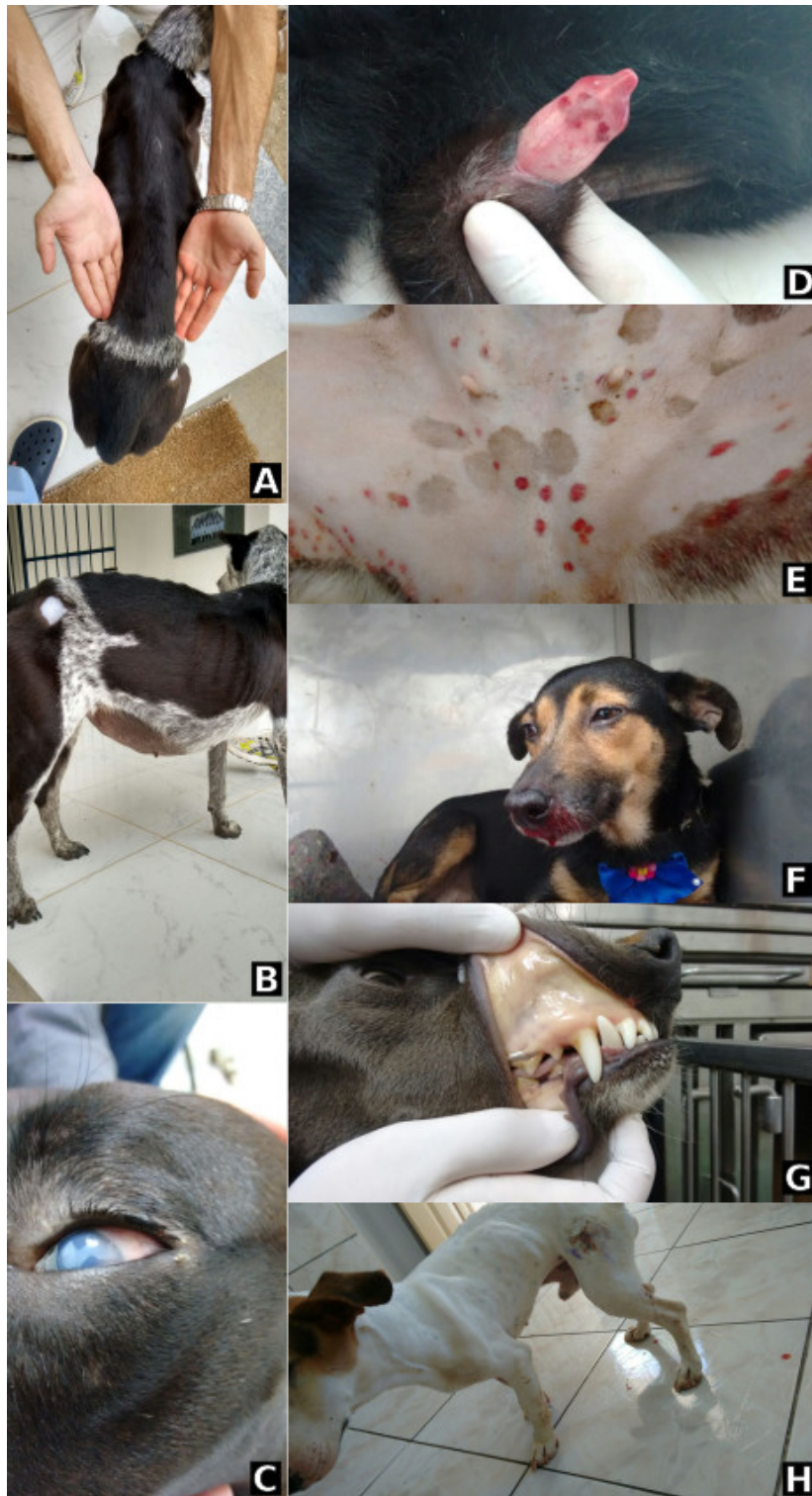


Figura 1: Cães participantes do projeto apresentando sinais clínicos de infecções transmitidas por vetores.

A-Caquexia B-Ascite C-Uveíte D-Petéquias penianas E-Petéquias cutâneas
F-Epistaxe G-Mucosas ictéricas H-Emagrecimento

O segundo grupo foi composto por 100 cães, onde seus tutores foram convidados a levar seus animais a comparecer ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo – ES, após a realização de visitas “*in loco*”. Os cães foram selecionados aleatoriamente, independente de raça e sexo, com mais de um ano de idade, residentes nos sete distritos (Anutiba, Araraí, Café, Celina, Rive, Santa Angélica e São João do Norte) e na sede da cidade de Alegre-ES (Erro: Origem da referência não encontrada), onde destes, 50 animais pertenciam à área urbana e 50 a área rural, onde em cada distrito foi avaliado o mínimo de seis animais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal (Protocolo n^o 47/2015). Dez animais deste grupo que se encontraram clinicamente saudáveis e sem a presença de hemoparasitos através da nested-PCR, foram utilizados como grupo controle. Os tutores dos animais que participaram da pesquisa permitiram a utilização de seus cães para o experimento assinando o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice 1) atestando ciência dos termos do estudo e autorizando a participação.

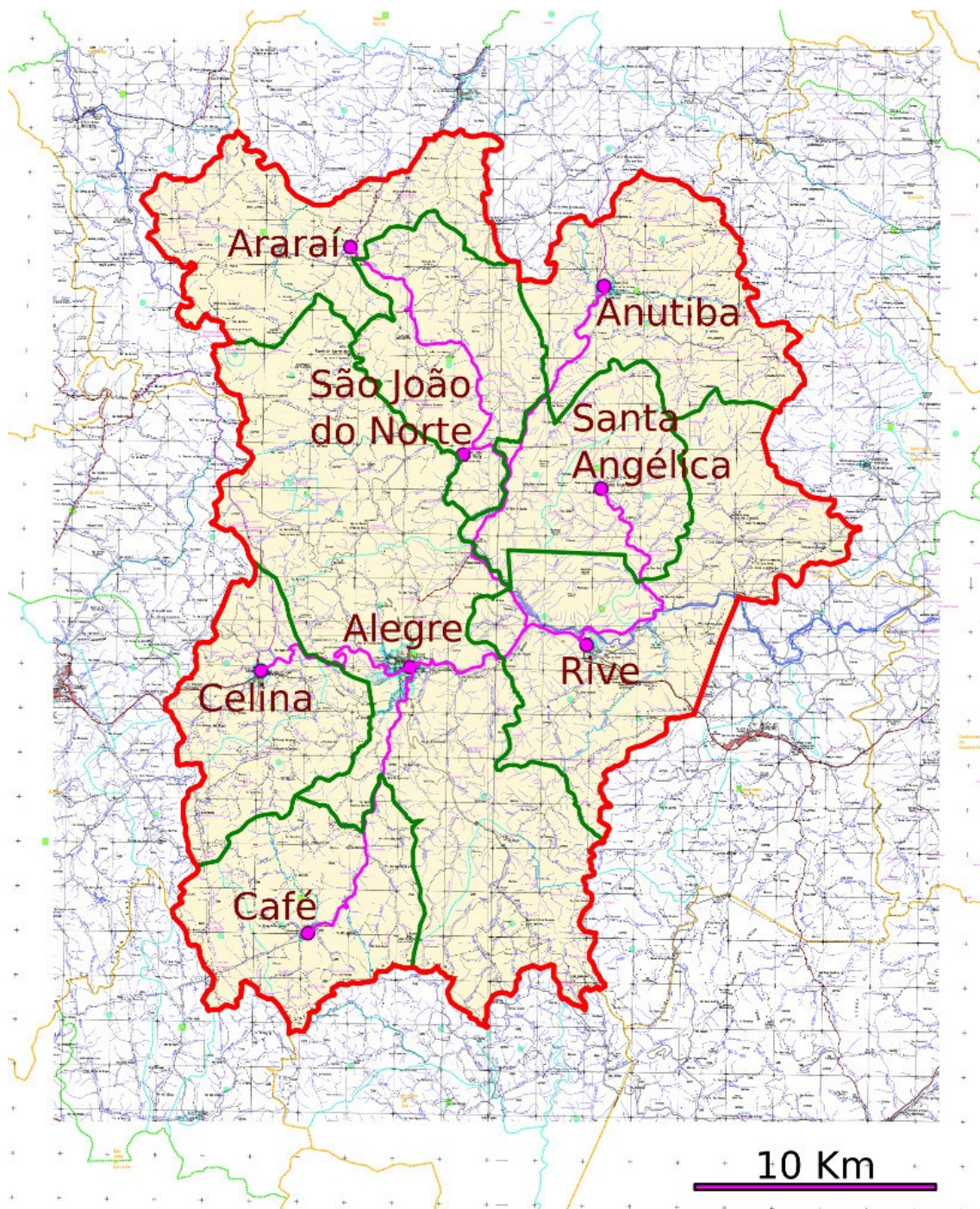


Figura 2: Mapa do município de Alegre-ES abrangendo os sete distritos e a sede participantes do estudo.

Fonte: Adaptado do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), ftp://geoftp.ibge.gov.br/cartas_e_mapas/mapas_para_fins_de_levantamentos_estatisticos/censo_demografico_2010/mapas_municipais_estatisticos/es/alegre_v2.pdf, 2016. Distâncias a partir da sede: Anutiba 27Km, Araraí 33Km, Café 16Km, Celina 12Km, Rive 11Km, Santa Angélica 23Km, São João do Norte 19Km.

3.2. Tratamento

Foi realizado o tratamento dos animais suspeitos de hemoparasitose, independente do perfil infeccioso, com, pelo menos, três dos critérios estabelecidos por Neer et al, (2002). Utilizou-se cloridrato de doxiciclina genérica na dosagem de 10 mg/kg uma vez ao dia, por 28 dias. Estes animais foram avaliados no tempo D1 (antes do tratamento) e no tempo D2 (depois de 28 dias de tratamento). Foram excluídos do estudo todos os animais que não realizaram o tratamento de forma correta.

3.3. 1.1. Avaliação Física dos cães

Foi realizada avaliação física completa dos 24 cães suspeitos de apresentarem infecção por algum hemoparasito, estes dados foram preenchidos em uma ficha denominada “Ficha de Avaliação Física” dos cães participantes do projeto. Esta ficha continha informações como: identificação do animal, histórico clínico, exame geral e exame dos sistemas (Apêndice 2).

3.4. 1.2. Avaliação epidemiológica - Fatores de Risco

Realizou-se entrevista com cada tutor e visita “*in loco*” (Figura 3) do local de habitação dos 100 cães convidados a participarem do estudo. Com as informações obtidas preencheu-se uma ficha denominada “Ficha de Fatores de Risco Epidemiológicos”. Esta ficha continha informações como: identificação do tutor e do cão, local de habitação e manejo dos cães (Apêndice 3).



Figura 3: Amostra de locais e animais das áreas rurais e urbanas visitados para a realização do estudo.

3.5. Coleta das amostras biológicas

Foi coletado cerca de oito ml de sangue a partir da punção da veia cefálica e/ou jugular com prévia assepsia do local. Este sangue foi armazenado em quatro microtubos VACUPLAST[®] contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 10% para realização de esfregaço sanguíneo, hemograma, capa leucocitária e para posterior realização de extração de DNA; e em dois tubos estéreis sem anticoagulante BD Vacutainer[®], para obtenção do soro para a realização das análises dos bioquímicos séricos e avaliação hormonal.

Realizou-se coleta de urina através de cistocentese, onde os cães foram colocados em decúbito dorsal com prévia assepsia. Com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha estéril 25x7 mm coletou-se dez ml de urina, divididas em duas alíquotas de cinco ml para a realização de urinálise e análise de bioquímicos urinários.

3.6. Processamento das amostras

3.6.1. Esfregaço sanguíneo, capa leucocitária e hemograma

A partir do sangue armazenado em microtubos contendo EDTA a 10% realizou-se imediatamente a fabricação de esfregaços sanguíneos após a coleta. Estes foram então corados com Panótico rápido (Laborclin[®]) para a realização da contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica das células sanguíneas. Para a realização da contagem diferencial de leucócitos utilizou-se microscopia de luz (Olympus[®] X40), com objetiva de imersão realizada em 100 células, contadas em região da cauda do esfregaço.

Para a realização do exame parasitológico direto foram confeccionadas capas leucocitárias, utilizando à microcentrífuga (Mod N1 1807 – Nova Instruments[®]) a 2000 rpm por 5 minutos para a separação da capa de leucócitos, onde posteriormente foi colocada sobre uma lâmina de vidro e realizado o esfregaço com auxílio de lâmina de esfregaço. Estas lâminas foram coradas com Panótico rápido (Laborclin[®]) e avaliadas durante cinco minutos para realização da pesquisa (Figura 4).

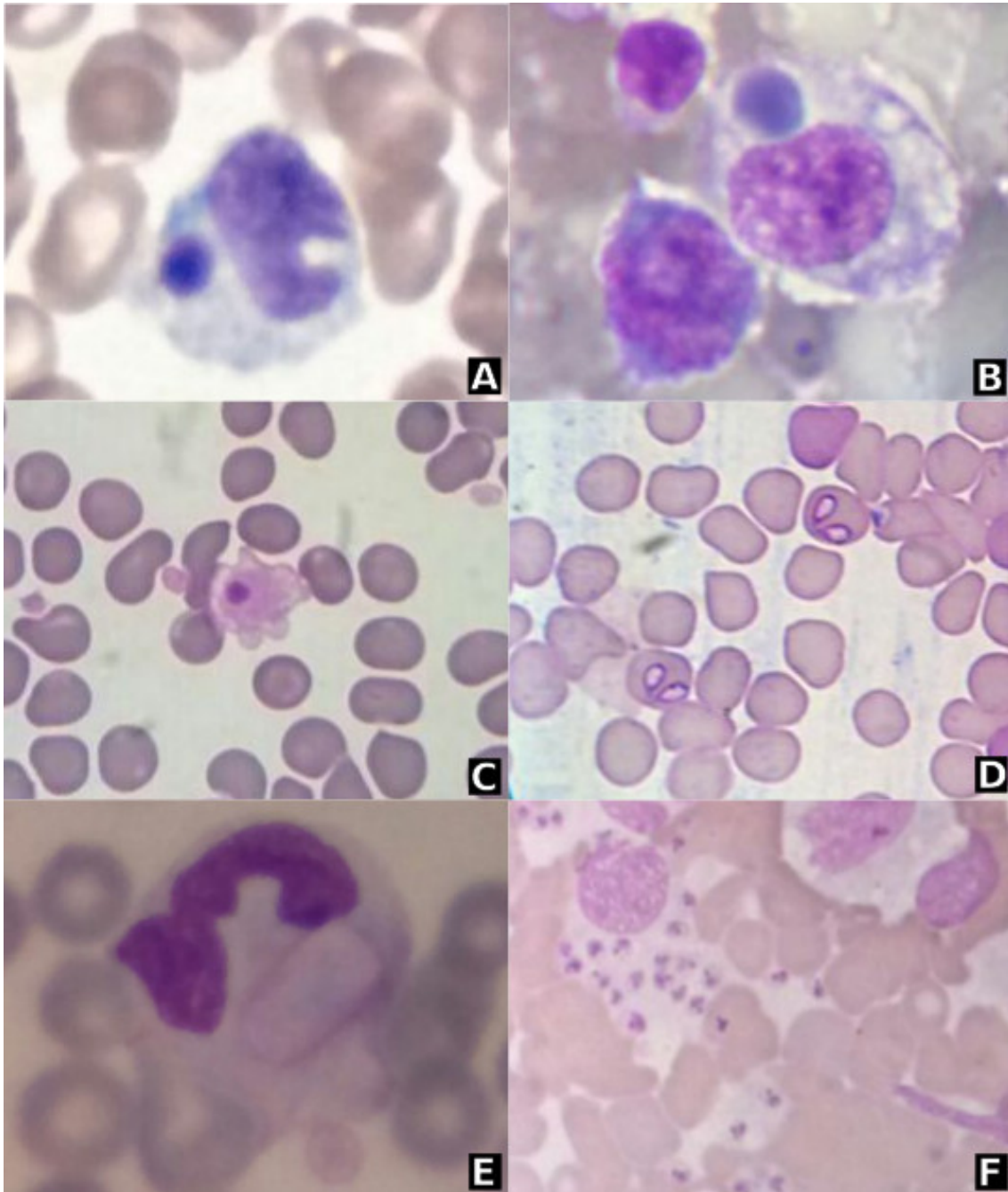


Figura 4: Observação de hemoparasitos presentes em sangue de cães naturalmente infectados.

A e B-Mórula de *Ehrlichia canis* em leucócitos, aumento de 100X C-*Anaplasma platys* em plaqueta, aumento de 40X D-*Babesia canis vogeli* em eritrócito, aumento de 40X E-*Hepatozoon canis* em monócito, aumento de 100X F-*Leishmania infantum chagasi* em medula óssea, aumento de 40X.

Para a confecção do hemograma utilizou-se o analisador automático (Mindray® BC-2800VET) que fornece a contagem automática de hemácias, leucócitos totais, plaquetas e concentração de hemoglobina e os valores de volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e distribuição da largura das células vermelhas (RDW). Foram conferidas em lâmina todas as contagens de plaquetas que se encontravam fora dos valores de referência na qual era realizada a contagem da média do número de plaquetas em cinco campos em 100X, com posterior multiplicação por 20.000 (Jain, 1993),

3.6.2. Bioquímicos séricos

Todas as análises bioquímicas foram realizadas com Kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A de acordo com as normas do fabricante e realizadas a partir dos soros obtidos dos sangues armazenados em tubos estéreis sem anticoagulante. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS 2000). Foram incluídos nestas análises: proteínas totais (Ref. 19), albumina (Ref. 99), aminotransferase de alanine – ALT (Ref. 108), aminotransferase de aspartate - AST (Ref. 109), gamaglutamiltransferase – GGT (Ref. 105), fosfatase alcalina – FA (Ref. 79), ureia (Ref. 1013), creatinina (Ref. 96), cálcio (Ref. 90), fósforo (Ref. 12), creatina quinase – CK (Ref. 117), e lactato desidrogenase – LDH (Ref. 86). As globulinas foram obtidas pela diminuição simples dos valores das albuminas das proteínas totais.

3.6.3. Fibrinogênio

A partir do sangue coletado e armazenado em tubo estéril contendo EDTA a 10%, utilizou-se a técnica clássica de precipitação pelo calor, descrita por Schalm et al, (1970) para a obtenção dos valores de fibrinogênio.

3.6.4. Hormônios Tireoidianos

A avaliação das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos triiodotironina (TT3), tetraiodotironina (TT4), tetraiodotironina livre (T4L) e hormônio estimulante da tireoide canina (TSHc) foram mensurados antes (D1) e 28 dias após o início do tratamento com doxiciclina (D2). A concentração total de TT3, TT4 e T4L foi mensurado por quimioluminescência, um ensaio competitivo (Immulate 2000 human total T4, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL), a concentração sérica TSHc foi mensurado pela técnica de quimioluminescência (Immulate 2000 Canine TSHc, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). As amostras de soro foram inicialmente armazenadas a -20°C em tubos plásticos, e transportadas em gelo seco, para o Laboratório Hermes Pardini, divisão veterinária, Belo Horizonte, MG, onde foram armazenadas a -80°C até a análise. Todos os ensaios foram validados para utilização no cão. Os padrões, amostras e controles foram realizados em duplicata.

3.6.5. Urinálise

A urinálise foi realizada a partir da urina armazenada em seringas estéreis, que foram processadas em até no máximo uma hora após a coleta. Inicialmente realizou-se o exame físico urinário (cor, aspecto, odor e densidade, esta última com o auxílio do refratômetro manual). Quando a densidade urinária encontrava-se com valores maiores passíveis de leitura através do refratômetro, a urina era então diluída conforme necessidade na porcentagem 1:2 ou 1:3 com água destilada e posteriormente multiplicada por dois ou três conforme a diluição para se calcular de forma adequada a densidade urinária. Posteriormente foi realizado o exame químico da urina através

de fita de urinálise – Uriquest Plus Vet[®] que verifica o ph, proteínas, glicose, corpos cetônicos, sangue e leucócitos. Foi realizado ainda o exame de sedimentoscopia, onde 5,0 mL de urina foram homogeneizados e centrifugados (Spinlab[®]) por cinco minutos a 2000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi analisado através de microscopia de luz (Olympus[®] CX40) uma gota de urina, entre lâmina e lamínula, onde observou-se presença de hemácias, leucócitos, flora bacteriana, presença de células, cilindros e cristais.

3.6.6. Bioquímicos urinários

Cinco ml de urina foram separados para a realização dos exames bioquímicos urinários. E para as referidas análises utilizaram-se os Kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A de acordo com as normas do fabricante. As urinas foram refrigeradas a uma temperatura entre 4°C e 8°C por no máximo 24 horas após suas coletas. Os exames foram realizados com o uso do analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS[®] 2000). Realizaram-se os seguintes exames: ureia urinária (Ref.1013), creatinina urinária (Ref.96), fosfatase alcalina urinária– FAu (Ref.79), gamaglutamiltransferase urinária – GGTu (Ref.105), proteína urinária (Ref.36) e a relação creatinina urinária/proteína urinária – UPC, foi obtida pela divisão simples entre seus valores. Realizou-se a correção da GGTu de acordo com De schepper et al, (1989) devido à utilização de amostra única de urina de cada animal.

3.7. Análises moleculares

3.7.1. Extração e pureza de DNA

Para o diagnóstico molecular dos hemoparasitos, primeiramente foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre- ES. Utilizou-se o protocolo com modificações do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification. As amostras para a realização da extração de DNA estavam previamente armazenadas em freezer a temperatura de -20⁰C, posteriormente foram descongeladas a temperatura ambiente, onde 300 µL de sangue foram adicionados a 900 µL da solução de lise celular e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Durante este período foram realizadas inversões gentilmente da mistura, com posterior centrifugação a 14.000 rpm por 20 segundos com descarte do sobrenadante. Este passo foi realizado por mais duas vezes, sendo, entretanto, incubadas por 10 minutos.

Após a última lavagem com descarte do sobrenadante, o pellet foi suspenso em ‘vórtex’ por 15 segundos para que este se soltasse do fundo do tubo. Adicionou-se assim 300 µL da solução de lise nuclear, sempre promovendo a homogeneização até que a mistura adquirisse um aspecto viscoso. Esta mistura foi então incubada a 37°C por uma hora. Posteriormente adicionou-se 100 µL de solução para precipitação de proteína, colocando-a no vórtex por 20 segundos com posterior centrifugação a 14.000 por 3 minutos. Foi transferido para um novo tubo contendo isopropanol com cerca de 300 µL do sobrenadante, gentilmente pipetado sem que o pellet presente fosse perturbado, homogeneizando até que o DNA pudesse ser visto. Então novamente foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. Foi vertido todo o sobrenadante em um descarte e colocou-se o tubo de plástico contendo o pellet para secar em cima de um papel toalha, para a retirada do excesso de isopropanol presente.

Adicionou-se 1000 µL de etanol a 70% e novamente a mistura foi centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se assim todo o sobrenadante. O tubo plástico com o pellet foi posto

então para secar durante 10-15 minutos sobre um papel toalha, para retirar o excesso de etanol a 70%. Foi adicionado no fim do tempo de secagem 60 µL de solução de reidratação de DNA e incubado a 65°C por 1 hora. Todas as amostras extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo®) para testar a quantidade de DNA e sua pureza, somente amostras com valor da relação de absorbância no comprimento de onda 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram incluídas nas análises subsequentes. As amostras foram então mantidas a -20°C para futura realização da nested-PCR.

3.7.2. Amplificação de DNA

A realização do diagnóstico molecular dos protozoários dos gêneros *Babesia sp.* e *Hepatozoon sp.*, e das riquetsias dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* foram feitos através da técnica de nested PCR (nPCR), permitindo uma maior sensibilidade da reação. A amplificação do DNA foi realizada nos laboratórios de Protozoologia Veterinária e Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Utilizou-se o termociclador (Eppendorf Mastercycler®) empregando os iniciadores conforme o Quadro 1, assim como os produtos de cada reação e seus respectivos programas. As condições para reação da nPCR para os diferentes hemoparasitos no termociclador encontram-se descritas no Quadro 2 e a programação para a reação nPCR foi realizada conforme consta no Quadro 3.

Quadro 1: Sequência de iniciadores utilizados para identificação dos gêneros de hemoparasitos.

Gênero	Sequência (5' – 3')	Iniciador	Alvo	Produto	Referência
Babesia/ Hepatozoon	1ª Reação CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-19 RIB-20	18S rRNA	1700	(Zahler et al., 2000)
	2ª Reação ACCTCACCAGGTCCAGACAG GTACAA- AGGGCAGGGACGTA	BAB- rumF BAB- rumR	18S rRNA	430	(Silveira et al., 2011)
Ehrlichia Monocítica	1ª Reação ACGGACAATTGCTTATAGCCTT ACA- ACTTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16S- CH1F NS16S- CH1R	16S rRNA	1195	(Kawahara et al., 2009)
	2ª Reação GGGCACGTAGGTGGACTAG CCTGT- TAGGAGGGATACGAC	NS16S- CH2F NS16S- CH2R	16S rRNA	443	(Kawahara et al., 2009)
Anaplasma/ Granu- locítica	1ª Reação CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC TTCCGTAAAGAAGGATCTAATCTCC	GE3a GE10r	16S rRNA	932	(Massung et al., 1998)
	2ª Reação AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT GG- CAGTATTAAGAAGCAGCTCCAGG	GE9f GE2	16S rRNA	546	(Massung et al., 1998)

Quadro 2: Condição para reação de nPCR para Babesia /Hepatozoon, Ehrlichia monocítica e granulocítica ou plaquetária. Utilizando os primers RIB19/20, NS16SCH1F/ NS16SCH1R, GE3a/GE10r para 1ª reação e BAB-rumF/BAB-rumR, NS16SCH2F/ NS16SCH2R e GE9f/GE2 para 2ª reação respectivamente.

Reagente	Volume(µL) 1ª reação	Volume(µL) 2ª reação
H ₂ O MiliQ	5.4	5.4
Mix primer (F+R)	0.6	0.6
Gold Taq Green Master MIX PROMEGA®	7.5	7.5
DNA/produto 1ª reação	1.5	1.5
Volume final	15	15

Quadro 3: Programa submetido ao termociclador para realização da Babesia /Hepatozoon, Ehrlichia monocítica e granulocítica ou plaquetária. Utilizando os primers RIB19/20, NS16SCH1F/ NS16SCH1R, GE3a/GE10r para 1ª reação e BAB-rumF/BAB-rumR, NS16SCH2F/ NS16SCH2R e GE9f/GE2 para 2ª reação.

Ciclos	Passos	Temp(°C)	Duração(min)
1 (1X)	Desnaturação inicial	94	5 min
2 (29X)	Desnaturação	92	1 min
	Anelamento	54	1 min
	Extensão	72	2 min
	Extensão final	72	8 min
3 (1X)	Extensão final	72	8 min
4	“Hold”	12	

3.7.3. Sequenciamento nucleotídico dos hemoparasitos

As amostras positivas após a realização da segunda reação da nPCR, foram purificadas pelo QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante, ou através de polietilenoglicol (PEG) (www.icb.ufmg.br/ibem). Posteriormente, cada amostra foi submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose 1% corado com GELRed (BIOTIUM), para confirmação da purificação das amostras.

O produto de PCR purificado foi sequenciado pela empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com) através de eletroforese capilar em aparelho ABI3130 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. As sequências consenso para

cada amostra resultaram do alinhamento das quatro sequências, com o auxílio dos programas do site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> e MEGA 6.0 software (Tanura et al., 2013).

As sequências obtidas do sequenciador foram analisadas quanto à qualidade, e os “Contigs” foram formados com o auxílio do programa “Electropherogram quality analysis”, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resource and Biotechnology (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). A identidade de cada sequência foi confirmada através da comparação com sequências depositadas no “GenBank” usando o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul et al., 1990).

3.8. Ensaio imunoenzimático indireto- ELISA

3.8.1. Obtenção da fração solúvel de antígenos

O protocolo para a técnica de ELISA foi executada segundo Ribeiro et al. (2007) utilizando a fase estacionária das culturas de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) fornecida como amostra referência pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose – FIOCRUZ. Resumidamente, os protozoários são lisados, centrifugados para se separarem dos fragmentos particulados e o sobrenadante foi dialisado para retenção e separação de moléculas solúveis com peso superior 20 KDa. O conteúdo obtido foi filtrado em filtros estéreis descartáveis de 22 mm, em condições assépticas e uma alíquota retirada para dosagem de proteína pelo método de Bradford. Para obtenção das massas de parasitos, foram produzidos 50 mL de meio LIT e distribuídos em garrafas tipo ROUX com capacidade para 1000 ml. Adicionando-se em seguida, 10 mL de cultura estoques de cepa padrão em crescimento logarítmico e incubando-se, em repouso a 23° C em estufa.

Após sete dias constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes as formas promastigotas foram separadas por centrifugação à 2000 rpm, durante 10 minutos à 4°C. O sedimento formado na centrifugação (1,5 mL) foi ressuspensionado em 20 volumes de PBS (4°C), contendo inibidor de protease (aprotinina e EDTA). Após suspensão do sedimento em PBS, foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições. O procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. A massa obtida foi armazenada à -30°C, até o momento do preparo dos extratos antigênicos.

A massa de parasito foi então submetida a cinco ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (37°C), bruscos para rompimento dos parasitos seguido de sonicação com três ciclos durante 1 minuto a 40 Watts, em banho de gelo em ultrassom, resultando em uma mescla de antígenos particulados e antígenos solúveis em volume total de 2,0 mL por garrafa Roux. Após, para cada 2,0 mL de material obteve-se 0,5 mL de antígeno solúvel através de centrifugação a 11.000 g / 1 hora e 30 minutos / 4°C. Este sobrenadante após a centrifugação foi transferido para sacos de diálise e dializados em PBS, durante um dia e meio, submetido então a quatro trocas do PBS a cada 6 horas. O material remanescente no saco de diálise foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 22 mm, em condições assépticas e uma alíquota retirada para dosagem de proteína pelo método de Lowry, sendo ajustado para 1.000mg/mL. Somadas coletas de diversas garrafas foram obtidos aproximadamente 10mL de antígeno solúvel sendo essas amostras alíquotadas em 100 eppendorfs com 0,1mL cada e congelados a -30 graus.

3.8.2. Execução do ensaio imunoenzimático - técnica de ELISA indireta

O ensaio foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY). A técnica consistiu em fixar antígeno solúvel de *Leishmania spp.*

nos poços da placa por 12 horas a 4°C seguido de lavagem com solução de lavagem (cloreto de sódio e Tween 20). Após a etapa de fixação foi realizado o bloqueio para evitar reações inespecíficas com 100µL/poço de solução de bloqueio contendo 616 uL soro fetal bovino(SFB) e 10 mL de PBS-1X e incubação por 45 minutos à 37°C.

Em seguida foram adicionados os soros dos cães do estudo, no volume de 100µL/poço diluídos a 1:40 em PBS-T. Após 45 minutos de incubação à 37°C as placas foram lavadas com solução própria quatro vezes e em seguida foram adicionados 100 µL/poço de anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sheep anti-dog IgG2 HRP conjugated) (A40-121P, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluída a 1:5000 em PBS-T. Após incubação por 45 minutos à 37°C, foram realizadas novamente quatro lavagens. A revelação foi feita com 100 µL/ poço de solução contendo 2 µL de peróxido de hidrogênio(H₂O₂) a 30% e 1 mg de orto-fenilenodiamina (OPD/SIGMA) em 10 mL de tampão citrato-fosfato (ácido cítrico - C₆H₈O₇; fosfato de sódio dibásico – Na₂HPO₄) pH 5,0 com incubação à 37° C por 10 minutos. A reação foi interrompida após os 10 minutos com 32µL de solução de ácido sulfúrico 2,5 M por poço e a placa lida imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm. A determinação da reatividade baseou-se em leituras superiores ao ponto de corte (cut off) calculado com a média da densidade ótica dos soros de três cães negativos (controles negativos) mais duas vezes o desvio-padrão da densidade ótica dos soros de três controles negativos (Tannus et al., 2007).

3.9. Teste rápido de imunoensaio por imunocromatografia

Foi utilizado o kit rápido Alere Leishmania Ac® para detecção qualitativa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* através da proteína recombinante rk28 (antígenos rK9, rK39 e rK26), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.10. Estatística

Para a realização do cálculo do n amostral, utilizou-se o programa estatístico OpenEpi – versão 3.01 (DEAN, 2013) para uma população finita de 6542 cães de acordo com informação verbal fornecida pela Vigilância Sanitária do Município de Alegre, devido ao ineditismo na região optou-se por se considerar o mínimo de prevalência de 5%, de acordo com os achados de Sales et al. (2015), com intervalo de confiança de 95%. Sendo obtido um n de 73 animais, entretanto para este estudo foram utilizados 100 cães para realização das análises.

Devido a grande variedade de testes estatísticos utilizados, em cada capítulo será descrito os testes empregados para a obtenção dos referidos resultados.

4. ARTIGO 1 - ASSOCIAÇÃO DE HEMOPARASITOSE COM RISCOS EPIDEMIOLÓGICOS PARA CÃES PROVENIENTES DE ÁREAS RURAIS E URBANAS NO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.

Association of hemoparasitoses with epidemiological risks for dogs from rural and urban areas in the southern state of Espírito Santo.

4.1. Resumo

As hemoparasitoses são causadas por diferentes agentes infecciosos, capazes de desencadear altas taxas de morbidade e mortalidade nos cães. O Brasil, por ser um país de dimensões continentais, observa-se grande divergência entre a ocorrência e os fatores de riscos associados às hemoparasitoses, em diferentes regiões. Objetivou-se identificar pela primeira vez através da nested PCR a ocorrência de *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães naturalmente infectados residentes em áreas rural e urbana do Município de Alegre-ES, bem como suas associações de riscos epidemiológicos.

Palavras chaves: carrapato, *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*

4.2. Abstract

Hemoparasitoses are caused by different infectious agents capable of leading to high rates of morbidity and mortality in dogs. As Brazil is a continental country, there is a great divergence between the prevalence and risk factors associated with hemoparasitosis in certain regions. The objective of this study was to identify for the first time through nested PCR the occurrence of *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs in rural and urban areas of Alegre-ES, as well as their associations of epidemiological risks.

Keywords: tick, *Anaplasma sp.*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*

4.3. Introdução

Anaplasmoses, babesioses, erliquioses e hepatozoonoses são doenças causadas por diferentes hemoparasitos, sendo causas comuns de morbidade e mortalidade nos cães (Kaewkong et al., 2014). Como o vetor destas hemoparasitoses é o carrapato, torna-se difícil o controle das doenças, principalmente em áreas rurais (Silva et al., 2014). No Brasil as hemoparasitoses mais frequentes são as causadas pelos agentes do gênero *Babesia sp.*, *Ehrlichia sp.* e *Hepatozoon sp.* (Silva et al., 2014).

A *Anaplasma platys* (*A. platys*) é o parasito responsável por promover a afecção conhecida como trombocitopenia cíclica (Harvey et al., 1978). No Brasil sua prevalência não foi verificada, existindo somente informações sobre algumas regiões do país como Ribeirão Preto (14.9%) Recife (48.78%) Paraná (19.4%) Minas Gerais (22.8%), Rio de Janeiro (17.2%) e Pantanal (7.19%) (Santos et al., 2009; Ramos et al., 2010; Da Silva et al., 2012; Costa-Júnior et al., 2013; Da Silva et al., 2016; Melo et al., 2016).

Entretanto a detecção da *A. platys* no país é geralmente baseada na observação direta do parasito, o que dificulta a determinação da prevalência da doença, pela baixa especificidade do teste (Ramos et al., 2009).

A *Babesia canis vogeli* (*B. canis vogeli*) é tida como o principal agente causador da babesiose canina no país (Passos et al., 2005). Existe grande variedade de sinais clínicos que cães com babesiose podem desenvolver, pois a doença pode se manifestar na forma crônica ou subclínica, aguda ou hiperaguda (Ramsey, 2012).

A erliquiose monocítica canina é uma doença provocada pelas bactérias do gênero *Ehrlichia*, com elevada prevalência e importância médico veterinária. Com o advento de técnicas moleculares mais modernas, diferentes patógenos como *Ehrlichia ewingii* (Oliveira et al., 2009) e *Ehrlichia muris* (Hegarty et al., 2012) têm sido correlacionados com sinais clínicos de erliquiose em cães, porém a *Ehrlichia canis* (*E. canis*) continua como o principal agente etiológico da erliquiose canina no Brasil (Vieira et al., 2011). Segundo Moraes et al. (2004), 20% da população de cães atendidos em hospitais ou clínicas veterinárias apresentam anticorpos contra *E. canis*. Nesta população, entretanto, observa-se variância de positividade em relação à localidade estudada, onde em determinadas regiões foi observado positividade em mais de 60% dos cães testados, demonstrando a grande importância da doença no país (Azevedo et al., 2011; Tanikawa et al., 2013; Witter et al., 2013).

No Brasil o *Hepatozoon canis* (*H. canis*) é o mais importante agente causador da hepatozoonose (Forlano et al., 2007). Sua presença já foi descrita nas regiões norte, nordeste, sul, sudeste e centro-oeste com prevalência, variando de 1 a 77,39% (Mundim et al., 2008; Spolidorio et al., 2011; Demoner et al., 2016; Gomes et al., 2016; Harvey et al., 2016; Malheiros et al., 2016).

Segundo Hi et al. (2015), todos os médicos veterinários devem estar cientes da proporção de patógenos transmitidos por carrapatos, em sua região. Desta maneira é importante que em cada localidade se realize o estudo de prevalência e riscos epidemiológicos, associados às hemoparasitoses em cães.

Devido a grande importância das hemoparasitoses, objetivou-se identificar pela primeira vez, pela nested PCR, a ocorrência de *Anaplasma sp*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, em cães naturalmente infectados em áreas rural e urbana do município de Alegre, sul do Espírito Santo, bem como suas associações de riscos epidemiológicos.

4.4. Metodologia

O estudo foi realizado em áreas rural e urbana do município de Alegre (sede e os sete distritos: Anutiba, Araraí, Café, Celina, Rive, São João do Norte e Santa Angélica), região sul do Espírito Santo, pertencente à região sudeste do Brasil, latitude 20° 45' 49" S e longitude 41° 31' 57" W, município com área de 772 km², e população estimada de 32.175 habitantes no ano de 2016 (IBGE, 2016) e 6.542 cães (Vigilância ambiental do Município de Alegre)¹.

4.4.1. Animais

O estudo foi composto por 100 cães domiciliados e semidomiciliados, com 50 animais pertencentes à área urbana e 50 à área rural, onde em cada distrito foi avaliado o mínimo de seis animais. Foram incluídos cães assintomáticos para hemoparasitose no momento da avaliação, inde-

1 Informação verbal

pendente de raça e sexo, com mais de um ano de idade. Para a realização do cálculo do n amostral, utilizou-se o programa estatístico OpenEpi – versão 3.01 (DEAN, 2013) para uma população finita de 6542 cães, devido ao ineditismo na região optou-se por se considerar o mínimo de prevalência de 5%, de acordo com os achados de Sales et al. (2015), com intervalo de confiança de 95%. Sendo obtido um n de 73 animais, entretanto para este estudo foram utilizados 100 cães para realização das análises.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da universidade Federal do Espírito Santo, com número 47/2015.

4.4.2. Avaliação epidemiológica – Fatores de Risco

Realizou-se entrevista estruturada com roteiro de perguntas previamente estabelecido, com cada tutor, os quais foram convidados a participarem do estudo. As entrevistas foram realizadas nas visitas “in loco” dos locais de habitação dos cães. Com as informações obtidas preencheu-se a “Ficha de Fatores de Riscos Epidemiológicos”.

4.4.3. Coleta das amostras biológicas

Após esclarecimento e leitura, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelo tutor de cada cão, quando se coletou cerca de 2,0 mL de sangue, com prévia assepsia do local, por punção da veia cefálica e/ou jugular. O sangue foi armazenado em microtubos VACU-PLAST® contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 10% para posterior realização de extração de DNA.

4.4.4. Análises moleculares

O DNA foi extraído a partir de 300µL de sangue de cada cão, com o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. A PCR foi realizada pelas técnicas convencional e nested PCR (nPCR). Utilizou-se uma alíquota do primeiro produto de PCR amplificado para a segunda reação de nPCR. Os iniciadores foram utilizados para detectar: *Anaplasma sp.*, *Babesia spp*, *Ehrlichia sp.* e *Hepatozoon sp.* conforme Silveira et al. (2011).

Os produtos da amplificação da PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1% (40 min, 100 V), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras positivas foram purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Biotecnologia Brasil, São Paulo, Brasil) conforme o fabricante. E sequenciadas com o Applied Biosystems modelo ABI3130 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o Applied Biosystems BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (v.3.1), com o polímero POP-7™ como matriz de separação e os primers utilizados na reação de PCR. As sequências consenso para cada amostra resultaram do alinhamento das quatro sequências, com o auxílio dos programas do site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> e MEGA 6.0 software (Tanura et al., 2013). A identidade de cada sequência foi confirmada por comparação com as sequências disponíveis no GenBank com auxílio do software BLAST (Altschul et al., 1990).

4.4.5. Estatística

Após análise descritiva dos dados realizou-se um estudo de dispersão de frequência pelo teste de qui-quadrado. Considerou-se significativa, as diferenças com $p < 0,05$.

4.5. Resultados

Dos 6542 cães domiciliados ou semidomiciliados existentes no município de Alegre no ano de 2016, segundo a vigilância ambiental², foram avaliados 1,5% da população total (n=100), dos quais 64% apresentaram positividade para um ou mais hemoparasitos pela nPCR, conforme distribuição na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição em porcentagem de cães hemoparasitados no Município de Alegre pertencentes as áreas rural e urbana.

Localidade	Animais avaliados por localidade	<i>E. canis</i>	<i>B. vogeli</i>	<i>Anaplasma sp.</i>	<i>H. canis</i>	Co-infectados	Taxa total de infecção (%)
Rural	50	4,0%	8,0%	4,0%	66,0%	6,0%	76,0%
Urbana	50	4,0%	4,0%	-	44,0%	-	52,0%
Total	100	4,0%	6,0%	2,0%	55,0%	3,0%	64,0%

Dos 100 cães avaliados o hemoparasito com maior prevalência foi o *Hepatozoon canis*, detectado em 55% da população, seguido por *Babesia canis vogeli* em 6%, *Ehrlichia canis* em 4% e *Anaplasma sp.* em 2% dos animais avaliados pela técnica de nPCR .

Os cães residentes na área rural apresentaram os dois (100%) casos de infecção por *Anaplasma sp.*, quatro apresentaram parasitismo por *B. canis vogeli*, dois foram positivos para *E. canis* e 33 dos cães estavam positivos para *H. canis*.

De todos os hemoparasitos pesquisados, os cães do distrito de São João do Norte mostraram uma taxa de infecção de 100%, enquanto que em Araraí e Santa Angélica a infecção foi de 83,3%, em Rive de 76,9%, no Café 66,7%, em Celina 42,9% e Alegre à taxa de infecção foi de 54,0%.

Portanto, 76% dos cães das áreas rurais e 52% dos cães de área urbana (Tabela 1) estavam infectados, entretanto apesar da diferença porcentual dos resultados o local de moradia não demonstrou ser um fator de risco epidemiológico.

Observa-se maior presença de cães infectados nas áreas rurais da região estudada e ainda há presença de coinfeções em 3% dos cães avaliados, no distrito de Rive observou-se presença de 2/13 animais com coinfeção, sendo um cão com *Anaplasma sp.* + *H. canis* e um cão com *B. canis vogeli* + *E. canis* e no distrito de São João do Norte um cão apresentou coinfeção com *E.canis* + *H. canis*. Este estudo mostra uma alta ocorrência de hemoparasitos nos cães da região rural e urbana de Alegre.

² Informação verbal.

De todos os cães incluídos no projeto, 53% apresentaram-se com carrapatos no momento da entrevista, destes cães 71,7% estavam hemoparasitados. Segundo relatos dos tutores, 85% dos cães tiveram presença de carrapatos nos 12 meses prévios a análise, onde, 66% destes cães foram positivos, para, pelo menos, um, dos hemoparasitos identificados pela nPCR.

Dentre os tutores da população rural (58%) e da população urbana (24%) relataram já terem sido picados por carrapatos, ao menos uma vez.

Foi relatado que 54% dos tutores utilizavam algum método profilático contra carrapato nos cães, e 79% usavam produtos carrapaticidas, quando os cães já mostravam a presença de carrapatos.

Em somente 8% dos cães, os proprietários relataram que já haviam apresentado hemoparasitose, e todos receberam tratamento medicamentoso sem interrupção. Porém, 46% dos tutores declararam não saber se seus cães já haviam ficado doente, em consequência de infecção causada pelos patógenos, alvo do estudo.

A maior parte dos cães avaliados pelo estudo, 79% era sem raça definida e 92% tinham de um a oito anos de idade, onde a média de idade dos cães da área rural foi de 3,4 anos e da área urbana foi de 4,3 anos.

De todos os cães, 71% conviviam com outros animais em seus domicílios, e destes, 33,8% mantinha contado somente com animais da mesma espécie, 15,5% somente com animais de outra espécie e 46,5% com animais da mesma e de outras espécies.

Desse estudo 56% dos cães, nunca tinham sido avaliados por um médico veterinário, onde 68% dos cães das áreas rurais e 40% dos cães da área urbana, nunca foram à consulta um com médico veterinário. Desses cães, 95% tinham acesso à rua, com ou sem supervisão do tutor, com exceção de um cão, todos os outros animais das áreas rurais eram mantidos soltos e quatro cães da área urbana não tinham acesso à rua.

Pelo baixo número de animais com *Anaplasma sp.*, *B. canis vogeli* e *E. canis*, não foi possível observar fatores de risco nos animais da região estudada e sua correlação com a infectividade destes hemoparasitos. Entretanto, nos cães com *H. canis*, foi possível estabelecer a presença de fatores de risco nos cães, cujos tutores não realizavam nenhum manejo curativo, quando o animal tinha presença de carrapato ($p < 0,02$), os cães com histórico prévio de hemoparasitose apresentaram risco de infecção ($p < 0,003$), para os cães que não eram únicos em casa e conviviam com outros cães, houve risco de infecção ($p < 0,03$) e os que não nunca foram ao médico veterinário ($p < 0,04$) o risco foi significativo.

4.6. Discussão

Observou-se presença de infecção por *Hepatozoon canis* em 55% dos cães testados, sendo que 60% residiam nas áreas rurais avaliadas. Estes resultados corroboram com os achados descritos por Spolidorio et al. (2009) na região norte do estado do Espírito Santo, onde identificaram 58,7% de positividade nos cães avaliados.

O'Dwyer et al. (2001) reportaram que pouco se sabe a respeito dos fatores de riscos associados a infecção por *H. canis* no Brasil. Assim como Spolidorio et al. (2009), o presente trabalho não evidenciou a localidade de moradia dos cães como um fator de risco para doença. Adicional-

mente, o presente trabalho observou correlação entre a hepatozoonose e os cães que não receberam manejo curativo quando havia presença de carrapatos, assim como com os que tinham histórico prévio de hemoparasitose, ou que conviviam com outros cães, ou ainda que nunca tivessem sido levados ao médico veterinário.

Na literatura consultada não foi encontrado relato de anaplasmose em cães da região do sul do Espírito Santo, entretanto este estudo permitiu evidenciar a presença da infecção em 2% dos cães por *Anaplasma sp.*, da área rural. A ocorrência de *Anaplasma sp.* foi menor que a encontrada por Costa-Júnior et al. (2013) em áreas rurais de Minas Gerais e os autores estabeleceram maior prevalência do parasito, quando comparadas às áreas urbanas, semelhante a este estudo.

Houve ocorrência de 6% dos cães infectados por *Babesia canis vogeli*, e destes, 66,7% pertenciam às áreas rurais. Essa prevalência é inferior à encontrada por Spolidorio et al. (2010) na região norte do Espírito Santo, que demonstraram presença em 46,6% dos cães da área rural e 42,9% da área urbana, detectados tanto pela técnica molecular e sorológica.

Em quatro animais detectou-se a presença de *E. canis*, onde dois animais pertenciam a área rural e dois a urbana, e são resultados semelhantes aos obtidos por Sales et al. (2015) que encontraram na mesma região, em cães que foram atendidos no Hospital Veterinário de Alegre, a presença de 5,88% dos cães positivos para erliquiose canina, também foram semelhantes na forma de identificação destes hemoparasitos, por nPCR.

Apesar da *Anaplasma sp.*, *B. canis vogeli* e *E. canis* terem sido detectados na nPCR do sangue dos cães das áreas rurais estudadas, não foi possível estatisticamente estabelecer para nenhum destes hemoparasitos, presença de fator de risco associado ao local de moradia, devido ao pequeno número de animais positivos encontrados. Outros fatores de risco pesquisados por este estudo também não foram associados a nenhum dos hemoparasitos, como presença de carrapato no momento da entrevista ou durante os doze meses prévios, região rural ou urbana de habitação dos cães, maior distância em quilômetros da sede do município, altitude dos distritos, idade, sexo, raça ou se os cães convivem com animais de outras espécies.

A baixa taxa de coinfeção nos cães da região estudada era esperada (3%), visto que os animais alvos deste estudo apresentavam-se assintomáticos no momento da avaliação, pois segundo Rojas et al. (2014), as coinfeções são responsáveis por agravar os sinais clínicos dos cães com hemoparasitoses. Outro fator que pode justificar a falta de sinais clínicos dos cães infectados presente neste estudo é a fase na qual o animal se apresenta, como a fase subclínica de cães com erliquiose (Procajlo et al., 2011) e ainda devido ao relato que a maioria dos animais infectados com *H. canis* encontra-se sem a presença de sinais clínicos da doença, sendo classificados como assintomáticos (Kelly et al., 2013; Harvey et al., 2016).

Segundo o último consenso do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária – ACVIM, para a detecção de todos os pacientes com erliquiose canina o ideal é realização da associação dos resultados dos exames moleculares e sorológicos (Neer et al., 2002), entretanto estes últimos exames não puderam ser realizados no atual estudo, o que poderia significar uma menor taxa de identificação de hemoparasitos presentes na região pesquisada. Outra limitação do nosso estudo foi a impossibilidade de coleta de medula óssea e ou baço dos cães estudados, pois dependendo da fase clínica em que estes animais se encontravam, seriam locais mais adequados para a identificação do DNA dos hemoparasitos avaliados.

Um dado presente na região que chama atenção é a pouca idade média dos cães, tanto da área rural (3,4 anos), quanto da urbana (4,3 anos) declarada durante a pesquisa, sendo que 40% da população encontravam-se na faixa entre um e dois anos de idade. Este fato pode ser elucidado devido a três fatores regionais, um, a grande quantidade de animais que morrem, possivelmente por doenças infecciosas como a cinomose, parvovirose e leptospirose, pois durante a entrevista muitos tutores relataram que haviam perdido muitos cães com sinais clínicos compatíveis com as doenças como “quartos caídos”, “pus nos olhos”, “fezes com sangue” e “tirícia” (icterícia).

Outro fato que poderia explicar a maior presença de animais jovens no estudo é a alta taxa (95%) de cães com acesso à rua, o que pode levar a ocorrência de atropelamentos e envenenamentos.

E ainda, pelo alto número de cães 56% que nunca foram levados ao médico veterinário, desta forma estes animais não recebem nenhum tipo de cuidado preventivo ou curativo das doenças pelas quais possam ser acometidos.

Verificou-se nas respostas do questionário que 58% da população humana da área rural e 24% da urbana, relataram que foram picados, ao menos uma vez, por carrapatos. No ambiente familiar destas pessoas picadas, na área rural, 82,1% dos cães teve pelo menos uma presença de infecção por hemoparasito no período deste estudo, na área urbana 25% dos cães, o que possibilita risco de transmissão de hemoparasitoses aos humanos da região. O parasitismo por carrapatos em humanos no Brasil já foi relatado por Danta-Torres et al. (2006) e levanta uma questão em relação a capacidade deste artrópode ser o vetor de diferentes patógenos responsáveis pelas zoonoses (Nelder et al., 2016), inclusive causada pelos agentes deste estudo (Perez et al., 2006; Elhamiani et al., 2016).

4.7. Conclusão

Comprovou-se a ocorrência de *Anaplasma sp*, *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis*, na região do sul do Espírito Santo.

É o primeiro relato da existência de *Ehrlichia canis*, em área rural do Sul do Espírito Santo.

Foi observada baixa prevalência de *Anaplasma sp*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* nos cães assintomáticos da região.

A cidade de Alegre é uma área com alta prevalência para *Hepatozoon canis*, sendo observada presença de 55% dos cães infectados.

Os fatores de riscos avaliados foram significativos para cães com hepatozoonose, onde foi possível estabelecer que animais cujos tutores não realizavam manejo curativo quando o animal tinha presença de carrapato, os cães com histórico prévio de hemoparasitose, cães que não eram únicos em casa e conviviam com animais da mesma espécie, e que não nunca foram ao médico veterinário apresentavam maior risco de se infectarem com *H. canis*.

4.8. Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.

- AZEDEDO, S.S.; AGUIAR, D.M.; AQUINO, S.F.; et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. *Bra. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.
- COSTA-JÚNIOR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L.M.; et al. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dog in rural and urban áreas of Minas Gerais State, Brazil. *Prev. Vet. Med.*, v. 3-4, p. 321-326, 2013.
- DA SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.; et al. A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 5, p. 529-535, 2016.
- DA SILVA, G.C.; BENITZ, A, n. ; GIROTTO, A. et al. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, p. 379-385, 2012.
- DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L.A., BRANDÃO-FILHO, SP. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.
- DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M.; *OpenEpi: Open source epidemiologic statistics for public helth*, Versão. www.openEpi.com, atualizado 06/04/2013, acessado em 20/08/2014.
- DEMONER, L.C.; MAGRO, n. M.; DA SILVA, M.R.; et al. *Hepatozoon spp.* infections in wild rodents in an área of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 7, n. 5, p. 859-864, 2016.
- Elhamiani, K.S., Sahibi, H., Hing, M., et al. Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in two cities of northwestern Morocco. *PLoS One*, v. 11(8):e0160880, doi: 10.1371/journal.pone.0160880. eCollection, 2016.
- FORLANO, M.D.; TEIXEIRA, K.R.; SCOFIRLD, A. et al. Molecular characterization of *Hepatozoon sp.* from Brazilian dogs and its phylogenetic relation ship with other *Hepatozoon spp.* *Vet. Parasitol.*, v. 145, n. 1-2, p. 21-30, 2007.
- GOMES, L.A.; MORAES, p. H.; DO NASCIMENTO, L.C.; et al. Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern região of Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 7, n. 6, p. 1061-1066, 2016.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *J. Infect. Dis.*, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.
- HEGARTY, B.C.; MAGGI, R.G.; KOSKINEN, p. ; et al. *Ehrlichia muris* infection in a dog from Minnesota. *J. Vet. Inter. Med.*, v. 26, p. 1217-1220, 2012.
- HII, S.F.; TRAUB, R. J.; THOMPSON, M.F.; et al. Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne disiasas in northern Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 93, n. 3, p. 58-66, 2015.
- IBGE, IBGE | Cidades | Espírito Santo | Alegre. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=320020>>. Acesso em 10 de Setembro de 2016.

- KAEWKONG, W.; INTAPAN, p. M.; SANPOOL, O.; High throughput pyrosequencing technology for molecular differential detection of *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* in canine blood samples. *Tick Tick Borne Dis.*, v. 5, n. 4, p. 381-385, 2014.
- MALHEIROS, J.; COSTA, M.M.; DO AMARAL, R.B.; et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 7, n. 5, p. 893-900, 2016.
- MELO, A.L.; WITTER, R.; MARTINS, T.F.; et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil, *Med. Vet. Entomol.*, v. 1, p. 112-116, 2016.
- MUNDIM, A.V.; MORAIS, I.A.; TAVARES, M.; et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 153, n. 1-2, p. 3-8, 2008.
- NELDER, M.P.; RUSSELL, C.B.; SHEEHAN, n. J.; et al. Human pathogens associated with the blacklegged tick *Ixodes scapularis*: a systematic review, *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1529-y, 2016.
- O'DWYER, L.H; MASSARD, C.L; SOUZA, J.C.P. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 94, p. 143-150, 2001.
- OLIVEIRA, L.P.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO L.C.M.; et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 15, Supl. 2, p. 55-56, 2009.
- PASSOS, L.M.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.; et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 1, p. 81-85, 2005.
- PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; et al. Human infection with *Erlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann New York Acad. Scienc.*, v. 1078, n. 1, p. 110-117, 2006.
- RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; et al. Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 1, p. 18-27, 2009.
- RAMOS. R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol. Res.*, v. 5, p. 1115-1120, 2010.
- RAMSEY, I.K.; GUNN-MOORE, D.; SHAW, S. *Sistemas Hematopoiético e Linforreticular*. In: *Manual de doenças infecciosas em cães e gatos*. Editora Roca, 1 ed, São Paulo, p. 69-94, 2010.
- ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, v. ; et al. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.*, v. 199, n. 3-4, 121-128, 2014.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L. et al., Molecular evaluation of incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet. J.*, v. 1, p. 145-148, 2009.

- SILVA, M.C.A.; MUNDIM, A.V.; MENDONÇA, G.A.; et al. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. *Biosci. J.*, v. 30, Supl.2, p. 892-900, 2014.
- SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; RIBEIRO, M.F. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazamagouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerusdichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*,v.177, n. 1-2, p. 61-66, 2011.
- SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. et al. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espirito Santo, southeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, n. 1, p. 201-2016, 2010.
- SPOLIDORIO, M.G.; TORRES, M.M.; CAMPOS, W.N.S.; et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 20, n. 3, p. 253-255, 2011.
- TAMURA, K.; STECHER, D.; PETERSON, A.; et al. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Biol. Evol.*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TANIKAWA, A.; LABRUNA, M.B.; COSTA, A.; et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. *Res. Vet. Sci.*, v. 94, n. 3, p. 474-477, 2013.
- VIEIRA, R.F.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.; et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bra. Parasitol. Vet.*, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.
- WITTER, R.; VECCHI, S.N.; PACHECO, T.A.; et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitoses em Cuiabá, Mato Grosso. *Semin.: Cienc. Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 3811-3822, 2013.

5. ARTIGO 2 - DETECÇÃO DE REAÇÃO CRUZADA COM *BABESIA CANIS VOGELI*, *EHRlichIA CANIS*, *ANAPLASMA SP.* E *HEPATOZOON CANIS* EM TESTE ELISA PARA *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI* EM CÃES DE ÁREA NÃO ENDÊMICA

Detection of cross-reaction with *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma sp.* and *Hepatozoon canis* in ELISA test for *Leishmania infantum chagasi* in dogs from non-endemic area.

5.1. Resumo

Objetivou-se confirmar área não endêmica no município de Alegre, ES, para leishmaniose visceral canina e verificar possível a possível existência de reação cruzada ou coinfeção no teste ELISA com antígeno de *Leishmania infantum chagasi* com diferentes hemoparasitas. As amostras sanguíneas de 124 cães do município foram submetidas à extração de DNA da *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma sp.* e *Hepatozoon canis*, pelo nested PCR. Para detecção de *Leishmania infantum chagasi* utilizou-se o teste imunoenzimático ELISA com antígeno “in house” de *Leishmania infantum chagasi*, e as positivas foram retestadas pelo teste rápido *Leishmania Ac*[®] (Alere[™]). Dos 124 cães, 33 amostras (26,6%) foram positivas no ELISA, destas, uma continuou positivo no teste rápido. Das amostras positivas no ELISA, 18(54,5%) também foram no PCR para outras hemoparasitoses: 14 (42,4%) *Hepatozoon canis*; 3(9,1%) *Babesia canis vogeli*; 2(6,1%) *Ehrlichia canis*. E infecções mistas: 1(3,2%) *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*; 1(3,2%) *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*. Observou-se reação cruzada no ELISA para *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, e um alóctone positivo para *Leishmania infantum chagasi*. Conclui-se que o teste ELISA apresentou alto percentual de falsos positivos e que o município de Alegre –ES não foi possível identificar cães soropositivos para *Leishmania infantum chagasi*.

5.2. Abstract

The study objective was to confirm the municipality of Alegre/ ES as non-endemic area to leishmaniasis and verify possible crossed-reaction or co-infection by ELISA test with *Leishmania infantum chagasi* crude antigen. Blood samples of 124 dogs were submitted to DNA extraction of *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma sp.* e *Hepatozoon canis* by nested PCR technique. To detect *Leishmania infantum chagasi* an immunoenzymatic (ELISA) test with in house *Leishmania infantum chagasi* antigen was used, and positive samples were subsequently tested by *Leishmania Ac*[®] (Alere[™]) rapid test. Of 124 samples, 33 (26,6%) were positive in ELISA, but only one was positive in the rapid test. From ELISA positive samples, 18(54,5%) were also positive in PCR to other hemoparasitosis: 14 (42,4%) *Hepatozoon canis*; 3(9,1%) *Babesia canis vogeli*; 2 (6,1%) *Ehrlichia canis*. Concerning to Mixed-infections: 1(3,2%) *Babesia canis vogeli* and *Ehrlichia canis*; 1(3,2%) *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis*. Crossed-reaction was observed in ELISA test with *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* and one allochthonous was positive to *Leishmania infantum chagasi*. We concluded that ELISA presented high percentage of false positives, which might have being pronounced by testing dogs in non-endemic area. Concluded that the ELISA test showed a high percentage of false positives and that the municipality of Alegre-ES is a non-endemic area of *Leishmania infantum chagasi*.

5.3. Introdução

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania infantum chagasi* e sua transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas dos dípteros da *Lutzomyia longipalpis* (Gontijo e Melo, 2004; Quinnell et al., 2013). O cão é considerado o principal reservatório da leishmaniose visceral canina (LVC) no ambiente doméstico, servindo como fonte de infecção aos seres humanos (Brasil, 2006; Baneth e Solano-Gallego, 2012) e a prevalência da LVC em áreas endêmicas pode atingir de 20 a 40% da população (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

A leishmaniose visceral é considerada uma endemia e avança para áreas anteriormente livres, com expansão para os grandes centros urbanos (Romero e Boelaert, 2010). Nas últimas décadas, o aumento dos casos de LV no Brasil e o avanço da doença para áreas livres põe em dúvida o real impacto das medidas de controle que vem sendo preconizadas (Romero e Boelaert, 2010).

O diagnóstico da LV pode ser complexo, visto a variada sintomatologia que dificulta o diagnóstico clínico e as limitações de cada teste em particular. A identificação parasitológica tem baixa sensibilidade e, por isso, caráter limitado, sendo inapropriado na triagem de cães para controle epidemiológico da doença (Mettler et al., 2005; Quaresma et al., 2009). Em relação aos exames sorológicos a literatura é controversa a respeito da ocorrência de reações cruzadas e em relação à sensibilidade e especificidade deste teste (Romero e Boelaert, 2010). Ainda não existe um procedimento padrão ouro para o diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum chagasi*, especialmente na detecção da infecção assintomática (Cakan et al., 2010; Romero e Boelaert, 2010).

Em busca de maior acurácia, bem como melhorar a aplicabilidade dos testes no diagnóstico da doença, objetivou-se confirmar área não endêmica no município de Alegre, ES para leishmaniose visceral canina e verificar possível reação cruzada ou coinfeção com diferentes hemoparasitos, no teste ELISA com antígeno de *Leishmania infantum chagasi*, tendo como contra prova o teste Leishmania Ac[®] (AlereTM).

5.4. Metodologia

Foram incluídos no estudo 124 cães, independente de raça e sexo, com mais de um ano de idade, no município de Alegre, e que foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo.

Foram coletados 3,0 mL de sangue da veia cefálica e/ou jugular, armazenados em microtubos Vacuplast[®] com EDTA (ácido etilendiamino tetracético) a 10%, a -20°C para posterior extração de DNA. Parte do sangue, foi armazenado em tubos estéreis sem anticoagulante BD Vacutainer[®] para obtenção do soro, após centrifugação (Spinlab[®]) para realização do ensaio imunossorção enzimática – ELISA e teste rápido imunocromatográfico Leishmania Ac[®] (AlereTM).

Para o diagnóstico molecular dos hemoparasitos foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre- ES. Foi utilizado o protocolo conforme instruções do fabricante, com kit Wizard[®] Genomic DNA Purification.

A realização do diagnóstico molecular dos protozoários dos gêneros *Babesia* e *Hepatozoon*, e das riquetsias dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* foram realizadas por meio da técnica de nested PCR (nPCR), permitindo uma maior sensibilidade da reação (Quadro 4) segundo Silveira et

al. (2011). A amplificação do DNA foi realizada nos laboratórios de Protozoologia Veterinária e Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

O produto de PCR purificado foi sequenciado pela empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com) através de eletroforese capilar em aparelho ABI3130 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

Quadro 4: Sequência de iniciadores utilizados para identificação de gêneros de hemoparasitos pela técnica de nested PCR (nPCR).

Gênero	Sequência (5' – 3')	Iniciador	Alvo	Produto	Referência
Babesia/ Hepatozoon	1ª Reação CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-19 RIB-20	18S rRNA	1700	(Zahler et al., 2000)
	2ª Reação ACCTCACCAGGTCCAGACAG GTA- CAAAGGGCAGGGACGTA	BAB-rumF BAB-rumR	18S rRNA	430	(Silveira et al., 2011)
Ehrlichia Monocítica	1ª Reação ACGGACAATTGCTTATAGCCTT ACA- ACTTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1F NS16SCH1R	16S rRNA	1195	(Kawahara et al., 2009)
	2ª Reação GGGCACGTAGGTGGACTAG CCTGT- TAGGAGGGGATACGAC	NS16SCH2F NS16SCH2R	16S rRNA	443	(Kawahara et al., 2009)
Anaplasma/ Granulocítica	1ª Reação CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE3a GE10r	16S rRNA	932	(Massung et al., 1998)
	2ª Reação AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	GE9f GE2	16S rRNA	546	(Massung et al., 1998)

O protocolo para a técnica de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA foi executada segundo Ribeiro et al. (2007) utilizando a fase estacionária das culturas de *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) fornecida como amostra referência pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose – FIOCRUZ. Os protozoários foram lisados e centrifugados para a separação dos fragmentos particulados e o sobrenadante foi dialisado para retenção e separação de moléculas solúveis com peso superior 20 KDa. O ensaio foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY). A determinação da reatividade baseou-se em leituras superiores ao ponto de corte (*cut off*) calculado com a média da densidade óptica dos soros de três cães negativos (controles negativos) mais duas vezes o desvio-padrão, conforme metodologia descrita por Tannus et al. (2007).

O teste rápido de ensaio imunocromatográfico foi realizado nas amostras positivas no ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA, com o kit rápido Alere™ *Leishmania Ac*® para detecção qualitativa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* com a proteína recombinante rk28 (antígenos rK9, rK39 e rK26), conforme as recomendações do fabricante.

5.5. Resultados

De 124 amostras de sangue de cães avaliados, 33 (26,6%) ultrapassaram o *cut off* do ELISA para *Leishmania infantum chagasi* (*L. chagasi*). Dessas amostras positivas no ELISA, apenas uma (3%) foi positiva no teste imunocromatográfico rápido rK39, que corresponde ao cão que, segundo relato do tutor, morou por dois anos em Teófilo Otoni-MG, área endêmica para a LVC.

Das 124 amostras de sangue canino, 33 (26,6%) foram positivas no ELISA para *Leishmania infantum chagasi* e, destas, 22 (66,7%) encontravam-se positivas na PCR para outros hemoparasitoses. Onde, somente em um cão foi confirmado pelo teste rápido imunocromatográfico a infecção por *Leishmania infantum chagasi*, e representa (0,8%) (Tabela 2) das amostras testadas. Foi realizada a punção de medula do animal que apresentou os dois testes sorológicos positivos, confirmando a presença de amastigotas em medula óssea do cão

Tabela 2: Animais apresentando reação cruzada no teste ELISA para leishmaniose visceral canina, correlacionado com infecções por diferentes hemoparasitos testados.

POSITIVOS	Número de animais	Representatividade (%)*
<i>Hepatozoon canis</i>	14	42,4
<i>Babesia canis vogeli</i>	2	6,0
<i>Ehrlichia canis</i>	3	9,0
<i>Anaplasma sp.</i>	0	0
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Hepatozoon canis</i>	1	3,0
<i>Babesia canis vogeli</i> + <i>Ehrlichia canis</i>	2	6,0
Negativos	11	33,3
Imunoabsorção enzimática - ELISA	33	100

* Percentual dos animais positivos no teste ELISA para *L. infantum*, cuja infecção por outro hemoparasito foi comprovada por meio de nPCR.

5.6. Discussão

Observa-se na literatura consultada grande divergência em relação aos valores de sensibilidade e especificidade nos testes ELISA utilizados na rotina clínica (Peixoto et al., 2015). Essa diferença pode ser explicada pela utilização de diversas técnicas de ELISA empregadas, como por exemplo a utilização de antígeno de bruto de *Leishmania infantum chagasi* (*L. infantum*), pois o uso de antígenos brutos amplia o espectro do teste, aumentando sua sensibilidade, pois compreende uma série de epítomos antigênicos não específicos da *L. infantum* pesquisada, porém reduz a especificidade, uma vez que outras leishmanias, até de espécies não visceralizantes, assim como outros hemoparasitos podem apresentar epítomos similares (Barbosa-De-Deus et al., 2002; Mettler et al., 2005; Alves et al., 2012; Da Silva et al., 2013).

Neste estudo foi observada a existência de reação cruzada no ELISA com diferentes hemoparasitos como *Hepatozoon canis*; *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis* isoladamente e infecções mistas com *Babesia canis vogeli* x *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia canis* x *Hepatozoon canis* e também amostras negativas para os hemoparasitos testados, enquanto que Krawczak et al. (2015) encontrou pelo ELISA soropositividade entre *L. infantum* e *Ehrlichia canis* em 4,3%;

L. infantum e *Babesia canis vogeli* em 6,7%, das amostras testadas, mas nega a ocorrência de reação cruzada e justifica o achado da coinfeção por ambos os patógenos.

O presente trabalho foi desenvolvido em área não endêmica para a LVC e, dos 33 cães positivos pelo ELISA, 32 apresentaram resultados negativos no teste rápido imunocromatográfico, o que demonstra que a soropositividade não foi decorrente da infecção pela *L. infantum*, mas pela reação cruzada, comprovada por nPCR para *Babesia canis vogeli* (*B. vogeli*), *Ehrlichia canis* (*E. canis*), *Hepatozoon canis* (*H. canis*), o que não ocorreu com *Anaplasma platys* (*A. platys*). Os resultados do estudo não se assemelham aos descritos por Krawczak et al. (2015), pois estes autores relataram que no teste sorológico não ocorreu a presença de reação cruzada entre *L. infantum* e *Babesia sp.* e *Ehrlichia sp.* mas sim coinfeção.

Houve a presença de um cão coinfectado com *H. canis* e *L. infantum*, que apresentou ELISA positiva para *L. infantum* e nPCR positivo para *H. canis*, em área endêmica para hepatozoonose, mas não é endêmica para leishmaniose, portanto não houve reação cruzada, e sim coinfeção, pelo menos para este cão, fato que justifica os relatos de que os testes sorológicos são controversos devido à existência de resultados ambíguos aos que se refere a presenças ou não de coinfeções e de reação cruzada, como nos trabalhos de Barbosa-De-Deus et al. (2002), Ferreira et al. (2007), Oliveira et al. (2008); Alves et al. (2012), Krawczak et al. (2015) pois afirmam ou negam, que as técnicas sorológicas para detecção da LV podem mostrar significativo percentual de falsos positivos nas técnicas de ELISA, que utilizam antígenos brutos bem como nos testes de imunofluorescência indireta (RIFI).

Observou-se que 10 soros dos cães deste estudo foram positivos para ELISA e negativos, tanto pela nPCR quanto pelo teste imunocromatográfico rápido, para qualquer dos hemoparasitos estudados, portanto não podem ser atribuídos à reação cruzada destes patógenos, mas podem estar relacionados a outras infecções não pesquisadas, como com *Trypanosoma caninum* e *Trypanosoma cruzi* (Alves et al., 2012; Zanette et al., 2014), *Toxoplasma gondii* (Zanette et al., 2014) e *Neospora canis* (Zanette et al., 2014).

Houve um percentual de 26,6% (33/124) de animais positivos no teste ELISA, e a escolha pela confirmação do alto número de animais positivos, neste estudo, ocorreu por tratar-se de um teste reconhecido com alta sensibilidade, o que melhora a obtenção de resultados positivos. Optou-se por realizar a contraprova utilizando o teste imunocromatográfico por ser um teste que apresenta maior especificidade revelando os cães falsos positivos.

Devido à baixa especificidade dos testes sorológicos de ELISA e RIFI, recentemente, o Ministério da Saúde mudou a sua recomendação para os programas de controle epidemiológico da LVC. Até 2011, o teste de ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA era utilizado como triagem para leishmaniose, seguido pelo teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI 1:40) como confirmatório. Pela ocorrência de falsos positivos a partir de 2011, houve substituição para triagem o teste imunocromatográfico Dual-Path-Platform (DPP® teste rápido para LVC), seguido por ELISA como exame confirmatório (Brasil, 2011).

A escolha do teste rápido imunocromatográficos com antígenos rK26 e rK39 para a realização do presente estudo, ocorreu por ser um teste rápido e seguro corroborando com as observações de Quinnel et al. (2013) quando consideraram a agilidade dos resultados como um fator favorável dessa técnica, pois são obtidos em minutos após a coleta do sangue, tornando esse teste ideal

para os programas de controle da doença, pois permite que se tome a medida adequada no momento do diagnóstico positivo.

O ensaio imunocromatográfico mostrou-se mais específico, pois evidenciou os cães com sorologia falsos positivos, assim como nos estudos de Grimaldi et al. (2012), Da Silva et al. (2013), Ker et al. (2013), Krawczak et al. (2015) que compararam o ensaio com testes sorológicos de ELISA e RIFI e o teste de aglutinação direta (DAT). Entretanto, para Quinnel et al. (2013) há um significativo percentual de falsos negativos, questão resolvida quando é aplicado na mesma população um teste amplo, com grande sensibilidade, como o teste ELISA.

As técnicas moleculares podem ser utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral, mas optou-se pelo ensaio imunocromatográfico e ELISA porque são testes com menor custo, mais rápidos, com alto grau de especificidade e indicados para triagem, que era um dos objetos deste trabalho. Mesmo que a associação do PCR com as sorologias como teste confirmatório seja potencialmente perfeita, deve-se levar em consideração as questões operacionais, Quinnel et al. (2013) reportaram que a técnica molecular demanda capacitação técnica dos profissionais envolvidos, exige acondicionamento adequado das amostras e o processamento pode levar a um atraso no resultado.

Procurou-se realizar a associação de testes sorológicos com a nPCR no presente estudo, porque como reportado por (Cakan et al., 2010; Romero e Boelaert, 2010), ainda não se determinou procedimento padrão ouro para o diagnóstico de LVC, especialmente na detecção da infecção assintomática e a associação da PCR como técnica comprobatória em animais sorologicamente positivos é o panorama ideal. Há necessidade de aprimoramento da acurácia dos testes para detecção da LVC bem como de sua aplicabilidade, para tornar as medidas de controle da doença, mais eficazes, permitindo a melhor contenção do avanço da endemia pelo país.

5.7. Conclusões

O presente estudo indica a existência de reação cruzada no teste de ELISA com antígeno bruto de *L. infantum* com *Hepatozoon canis*, *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*.

Não foi evidenciado cão autóctone pertencente ao município de Alegre com sorologia positiva para *L. infantum chagasi*.

Deve-se levar em consideração à baixa especificidade observada no teste ELISA utilizando-se o antígeno bruto de *L. infantum*, desta forma, triagem epidemiológicas utilizando-se o teste devem ser realizadas com critério, realizando-se uma contra prova com testes mais específicos.

Os resultados encontrados reafirmam a orientação do Ministério da Saúde quanto à detecção da leishmaniose visceral canina, de se utilizar testes com alta especificidade e outro de maior sensibilidade.

5.8. Referências bibliográficas

ALVES, A.S., MOUTA-CONFORT, E., FIGUEIREDO, F.B., OLIVEIRA, R.V., SCHUBACH, A.O., MADEIRA, M.F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Research in Veterinary Science, v. 93, n. 3, p. 1329-1333, 2012.

- BANETH, G. e SOLANO-GALLEGO, L. Canine Leishmaniasis. In: Greene, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.735-748, 2012.
- BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M.L.; NUNES, A.Z. et al. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.
- BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006. Disponível em: <https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual_Vigilancia_Controlo_Leishmaniose_Visceral.pdf>. Acesso em: 13 de agosto de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta nº 1/ 2011. Esclarecimentos sobre a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). 2011. Disponível em: <http://crmvmms.org.br/files/materiais/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc_98999048.pdf>. Acesso em 13 de novembro de 2016.
- CAKAN, H., SUAT, S., VECDET, O., ERDAL, p. , MUSTAFA, A., BEKIR, K. Patients with suspected visceral leishmaniasis in Istanbul. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, n. 2, p. 103-109, 2010.
- DA SILVA, D.A.; MADEIRA, M. F.; ABRANTES, T.R. et al. Assesment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, v. 195, n. 2, p. 252-253, 2013.
- FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine leishmaniasis in animals presenting diferente clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, v. 146, p. 235-241, 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.
- GRIMALDI, G.Jr.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based in Dual-Path-Platform (DPP® CVL rapid test) for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.
- KAWAHARA, M.; RIKISHISA, Q.; LIN, E. et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia sp.* in wild deer and ticks on two major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1102–1109, 2006.
- KER, H.G.; COURA-VITAL, W. AGUIAR-SOARES, R.D.O. et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clinical Vaccine and Immunology*, v. 20, n. 12, p. 1792-1798, 2013.
- KRAWKCZAK, F.S.; REIS, I.A.; SILVEIRA, J.A. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs; co-infection or cross-reaction in serological methods? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 1, p. 64-69, 2015.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, J.H.; OWENS, W.L.; et al. Nested PCR assay for the detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 1090–1095, 1998.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G. et al. Evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay, an Immunofluorescent Antibody Test and 2 rapid tests (immunochromatographic Dipstick

and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic leishmanial infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

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

PEIXOTO, H.M.; OLIVEIRA, M.R.F.; ROMERO, G.A.S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health*, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015.

QUARESMA, F.P., MURTA, S.M.F., FERREIRA, E.C., ROCHALIMA, A.C.V.M., XAVIER, A.M.P., GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmanias* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real time-PCR. *Acta Tropica*, v. 111, n. 1, p. 289-294, 2009.

QUINNEL, R.J.; CARSON, C.; REITHINGER, R. et al. Evaluation of rK39 rapid test for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS One – Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 1, e. 1992, 2013.

RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH, A. DE O.; MOUTA-CONFORT, E.; et al. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania)* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 148, n. 3- 4, p. 200–6, 2007.

ROMERO, G.A.S e BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America. A systematic Review. *PLoS One – Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 1, e. 584, 2010.

SILVEIRA, J.A., VALENTE, P.C., PAES, p. R., et al. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 3, p. 242-245, 2015.

TANNUS, M. M.; RODRIGUES., F. H.; MASTRANTONIO, E. C.; et al. Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três espécies de *Leishmania*. *Horiz. Cient.*, v. 1, n. 1, p. 1–28, 2007.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; et al. Detection of a new pathogenic *Babesiamicroti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 89, 241–248, 2000.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V. M.F.; LAURENTI, M.D. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

6. ARTIGO 3 - HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES HEMOPARASITADOS ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM DOXICICLINA NO MUNICÍPIO DE ALEGRE – ES.

Biochemical and hematologic serum analyses of dogs infected with hemoparasites before and after treatment with doxycycline in county of Alegre – ES.

6.1. Resumo

Cães com diferentes hemoparasitoses são atendidos frequência na rotina clínica do médico veterinário no Brasil. Acredita-se que seja de importante valor a detecção de particularidades locais destas afecções. Objetivou-se com este estudo avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas séricas de cães com diferentes hemoparasitos, antes e depois do tratamento de cães com doxiciclina, no município de Alegre, ES. As alterações laboratoriais mais comuns foram: anemia normocítica hipocrômica, trombocitopenia, hipoalbuminemia e aumentos da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, antes do tratamento nos grupos de cães mono e coinfectados. Conclui-se que os cães do grupo de monoinfectados com *Ehrlichia canis* negativaram após o tratamento com doxiciclina. O grupo de cães coinfectados, com *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma platys*, não tiveram retorno aos valores de referência do hematócrito e hemoglobina, mesmo após o tratamento com o cloridrato de doxiciclina. O município de Alegre, na região do sul do Espírito Santo, pode ser considerado endêmico para hemoparasitoses, com grande taxa de reinfecção.

Palavras chaves: Anemia, trombocitopenia, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*.

6.2. Abstract

Dogs with different types of hemoparasites infections are commonly attended in veterinary medicine routine in Brazil. It is believed to be important the understanding about local particularities of these diseases. It was aimed in this study the evaluation of hematologic and biochemical alterations in dogs before and after treatment with doxycycline for different hemoparasite infections in County of Alegre. The most common laboratorial alterations were normocytic hypochromic anemia, thrombocytopenia, hypoalbuminemia and increase serum activity of alanine aminotransferase and alkaline phosphatase enzymes before treatment of monoinfected and coinfecting groups of dogs. It was concluded that dogs from the group monoinfected with *Ehrlichia canis* were completely recovered after treatment with doxycycline. The coinfecting group with *Babesia canis vogeli* and *Anaplasma platys* did not return to normal levels of hematocrit and hemoglobin, even after treatment with hydrochloride of doxycycline. The county of Alegre, south of Espírito Santo, would be considered endemic for parasite infections, with a high rate of reinfection.

Keywords: Anemia, thrombocytopenia, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*.

6.3. Introdução

Ehrlichia canis, *Anaplasma platys* e *Babesia canis vogeli* são importantes agentes causadores de hemoparasitose em cães no Brasil (Vieira et al., 2011; Lasta et al., 2013; Araújo et al., 2015).

Apesar da elevada prevalência de hemoparasitoses, o diagnóstico dessa afecção, pode representar um desafio para o clínico de pequenos animais (Dagnone et al., 2001), pois estes parasitos produzem uma ampla variedade de sinais clínicos inespecíficos.

Entretanto, apesar da inespecificidade das apresentações clínicas, foi possível correlacionar à infecção as alterações mais específicas em determinadas regiões (Sousa et al., 2010; Witter et al., 2013). Desta forma, acredita-se que a frequência destes sinais podem ser diferenciados dependendo da localidade estudada, e somado ao fato de que as análises laboratoriais poderão favorecer o diagnóstico deste grupo de doenças (Costa et al., 2015).

Objetivou-se avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas de cães com diferentes hemoparasitoses no município de Alegre-ES, realizando-se comparações entre os diferentes perfis infecciosos e a influência do tratamento com doxiciclina.

6.4. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal, da Universidade Federal do Espírito Santo - ES, sob o número 047/2015.

6.4.1. Seleção dos animais

Foram incluídos no presente estudo 23 cães maiores de um ano de idade, independentes de raça e sexo, apresentando pelo menos três critérios clínicos e ou laboratoriais compatíveis com hemoparasitose, conforme descrito por Neer et al., 2002 e 10 cães hígidos da mesma região, sem nenhum sinal clínico. Todos os cães foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, ES, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelos seus tutores.

6.4.2. Obtenção de amostra

Foram coletados 3 mL de sangue a partir da punção da veia cefálica e/ou jugular com prévia assepsia do local. O sangue foi armazenado em microtubos VACUPLAST[®] com EDTA (ácido etilendiaminotetracético) a 10% para a realização do hemograma com o analisador automático (Mindray 2800VET) que fornece a contagem automática de hemácias, leucócitos totais, plaquetas e concentração de hemoglobina e os valores de volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e distribuição da largura das células vermelhas (RDW). A gravidade da anemia seguiu os mesmos critérios de Drumont (2013).

Para o plaquetograma (PCT), o número de plaquetas do contador hematológico foi conferido em lâmina pela contagem da média do número de plaquetas em cinco campos em 100X, com posterior multiplicação por 20.000 (Jain, 1993).

Foram preparados esfregaços do sangue periférico corados com panótico rápido (Laborclin[®]) para a realização da contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica das células sanguíneas por meio da microscopia de luz (Olympus[®] CX40) com objetiva de imersão. Para a realização da pesquisa de hemoparasitos foram confeccionados as extensões das capas leucocitárias, com auxílio de microcapilares centrifugados (Nova Instruments[®]) a 10.000 rpm por 5 minutos.

O sangue coletado em tubos estéreis sem anticoagulante BD Vacutainer[®] foi utilizado para obtenção do soro para as análises bioquímicas, realizadas com os Kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A, de acordo com as normas do fabricante. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS 2000). Foram quantificados os valores de ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), cálcio (mg/dL), fósforo (mg/dL), proteína sérica (g/dL), albumina (g/dL), globulina (g/dL), e avaliados os valores da atividade sérica da fosfatase alcalina (FA/UL) e alanina aminotransferase (ALT/UL), Aspartato aminotransferase (AST/UL), gama glutamiltransferase (GGT/UL). Utilizou-se a técnica clássica de precipitação pelo calor, descrita por Schalm et al, (1970) para a obtenção dos valores de fibrinogênio (mg/L). Os valores de referência utilizados estão embasados em Kaneko et al. (1997).

Após a realização do hemograma e do fibrinogênio, o sangue foi mantido em refrigeração para posterior realização de extração de DNA.

6.4.3. Análises moleculares

O DNA foi extraído a partir de 300µL de sangue de cada cão, com o Kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. A PCR foi realizada pelas técnicas convencional e nested PCR (nPCR). Utilizou-se uma alíquota do primeiro produto de PCR amplificado para a segunda reação de nPCR. Os iniciadores foram utilizados para detectar: *Babesia* spp, membros da família Anaplasmataceae que infectam monócitos, granulócitos e plaquetas, descrito por Silveira et al. (2011).

Os produtos da amplificação da PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1% (40 min, 100 V), corados com GelRedTM (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras positivas foram purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Biotecnologia Brasil, São Paulo, Brasil) conforme o fabricante. E sequenciadas com o Applied Biosystems modelo ABI3130 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o Applied Biosystems BigDye[®] Direct Cycle Sequencing Kit (v.3.1), com o polímero POP-7TM como matriz de separação e os *primers* utilizados na reação de PCR. As sequências foram alinhadas, editadas e analisadas utilizando MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). A identidade de cada sequência foi confirmada por comparação com as sequências disponíveis no GenBank com auxílio do *software* BLAST (Altschul et al., 1990).

6.4.4. Formação dos grupos

De todos os 23 cães suspeitos, 18 foram positivos para hemoparasitos pela técnica da nested PCR (nPCR) e cinco foram excluídos por estarem doentes, mas sem presença de DNA hemoparasitos pesquisados pela nPCR. Os cães foram divididos em dois grupos: G1-10 cães com monoinfecção, G2-8 cães coinfectados, G3-10 cães selecionados, clinicamente saudáveis e nPCR negativos.

6.4.5. Tratamento

Todos os animais do G1 e do G2 receberam cloridrato de doxiciclina, na dose de 10 mg/kg SID por 28 dias, como droga única, pois é referenciada como efetiva para os diferentes hemoparasitos pesquisados (Neer et al., 2002; Niwetpathomwat, 2006; Gaunt et al., 2010), permitindo desta forma que os animais pudessem ser tratados de forma adequada.

Os animais foram avaliados no tempo D1 (antes do tratamento) e no tempo D2 (depois de 28 dias de tratamento). Aos animais do G3 não foi fornecido medicamentos visto que se encontra-

vam hígidos, estes foram utilizados como fonte de comparação com os outros grupos infectados e com os valores de referência (Kaneko, 1997).

6.4.6. Análise estatística

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado. Os dados quantitativos foram testados quanto à normalidade, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação dos dados, segundo o perfil de infecção (G1, G2 e G3) utilizou-se a análise de variância, seguida do teste de Fisher e Tukey ad-hoc, para os valores de hematócrito, HCM, linfócitos, monócitos e plaquetas, proteínas totais e globulinas, antes do tratamento, e hemoglobina, HCM, leucocitos totais, segmentados, linfócitos, monócitos e plaquetas, creatinina, fósforo, GGT, ALT, proteínas totais e albumina após o tratamento, por apresentarem distribuição normal. As demais comparações foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunns ad-hoc. Para análise comparativa dos resultados antes e após o tratamento (considerando apenas G1 e G2), os valores obtidos para hemoglobina, hematócrito, contagem total de linfócitos, monócitos e plaquetas, proteína total, albumina e globulinas apresentaram distribuição normal e foram, portanto, comparados pela análise de variância e teste de Fisher, enquanto as demais análises foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Considerou-se significativa as diferenças com $p < 0,05$.

6.5. Resultados

Em 18/23 (78,3%) cães houve a amplificação do DNA dos hemoparasitos pela nPCR e estes cães serviram como base para o estudo. Onde, antes do tratamento, 10/18 (55,55%) encontravam-se monoinfectados (G1) e 8/18 (44,45%) coinfectados (G2). Dos 18 cães hemoparasitados e positivos pela nPCR, apenas em 5/18 foram observadas a presença do agente em lâmina, 2/5 sugestivos de *Babesia* sp., em eritrócito, 2/5 de *A. platys* em plaquetas e 1/5 de *E. canis* em monócito.

No D1(Quadro 5), dos animais do G1, 6/10 estavam positivos para *E. canis*, 2/10 para *B. canis vogeli* e 2/10 para *A. platys*, isoladamente. Os cães do grupo G2 apresentaram coinfeção: 4/8 positivos para *E. canis* + *B. canis vogeli*, 2/8 *E. canis* + *A. platys*, 1/8 *E. canis* + *B. canis vogeli* + *A. platys*, 1/8 para *B. canis vogeli* + *A. phatys*.

Quadro 5: Perfil infeccioso de cada animal dos grupos monoinfectados (G1) e coinfectados (G2) antes e depois do tratamento.

Animal	Antes do tratamento - D1	Depois do tratamento - D2
Monoinfectados – G1		
1	<i>E. canis</i>	negativo
2	<i>B. canis vogeli</i>	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>
3	<i>B. canis vogeli</i>	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>
4	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>
5	<i>E. canis</i>	negativo
6	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>
7	<i>E. canis</i>	negativo
8	<i>A. platys</i>	negativo
9	<i>A. platys</i>	<i>A. platys</i>
10	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>
Coinfectados – G2		
1	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i> , <i>E. canis</i>	negativo
2	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>
3	<i>B. canis vogeli</i> , <i>E. canis</i>	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>
4	<i>B. canis vogeli</i> , <i>E. canis</i>	<i>B. canis vogeli</i>
5	<i>B. canis vogeli</i> , <i>E. canis</i>	óbito
6	<i>B. canis vogeli</i> , <i>E. canis</i>	<i>B. canis vogeli</i>
7	<i>A. platys</i> , <i>E. canis</i>	<i>A. platys</i> , <i>B. canis vogeli</i>
8	<i>A. platys</i> , <i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>

Dos 17 animais que completaram o estudo, (um animal do grupo coinfectado, com *E. canis* + *B. canis vogeli* foi a óbito), cinco negativaram para todos os hemoparasitos, quatro do G1 e um do G2; e 12 cães não apresentaram cura completa após os 28 dias de tratamento pela doxiciclina, pois, se mantiveram infectados ou se reinfectaram durante o decorrer do estudo. Destes cães 7/12 se infectaram com outro hemoparasito e 5/12 mantiveram-se com os mesmos hemoparasitos (Quadro 5).

Dos cães infectados antes do tratamento, 17/18 (94,4%) apresentaram anemia, no G1, 6/9 (66,67%) demonstraram anemia normocítica hipocrômica e 3/9 anemia normocítica normocrômica. Destes nove cães que apresentava anemia, 8/9 (88,9%) foi classificada como suave e 1/9 de moderada. No G2 4/8 (50%) dos cães apresentaram anemia normocítica hipocrômica, 3/8 anemia normocítica normocrômica e 1/8 anemia microcítica hipocrômica. Nos cães do G2 4/8 (50%) a anemia foi classificada como suave e 50% moderada. A infecção hemoparasitária desencadeou diferença nos valores da hematimetria, no D1 entre os grupos G3 com G1 e G2 ($p=0,0002$). Não foi observada diferença estatística entre G1 e G2, apesar da média do número total de eritrócitos no grupo G2, encontrar-se com valores inferiores ao G1 (Tabela 3). A diferença no número de eritrócitos, antes e depois do tratamento de cada grupo foi altamente significativa ($p<0,0001$). No D2 a média dos valores totais de eritrócitos do G1 e G2 retornou aos valores de referência.

Tabela 3: Média e desvio-padrão dos valores hematológicos dos cães pertencentes aos grupos monoinfectados (G1), coinfectados (G2) e controle (G3), antes (D1) e depois do tratamento (D2).

Analito	Monoinfectados - G1		Coinfectados - G2		Controle - G3	Referência
	D1	D2	D1	D2		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	4,7±0,8	5,8±0,7	4,1±1,2	5,6±1,6	6,8±0,7	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	9,7±1,5	12,3±1,7	8,1±2,3	11,6±3,6	14,8±1,7	12-18
Hematócrito %	30,4±4,3	38,8±4,6	25,4±7,4	35,8±9,7	45,2±5,1	37-55
VCM (fL)	65,4±2,3	66,2±2,3	61,6±3,6	63,6±1,6	66,7±2,0	60-77
CHCM (g/dL)	31,8±1,4,0	32,9±1	30,7±4,1	36,0±1,5	32,6±0,4	32-36
HCM (g/dL)	20,7±0,7	20,9±1,1	20,1±0,9	20,8±0,8	21,7±0,7	19,5-24,5
RDW (%)	12,4±1,4	13,8±1,1	13,6±1,9	13,3±1,0	12,2±1,1	12-15
Leucometria global (cél/μL)	7.820,0±2.984,3	11.730,0±4.599,0	10.711,1±8.367,3	11.371,4±4.482,5	10.750,0±2.320,6	6.000-17.000
Metamielócios (cél/μL)	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±96,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Bastões (cél/μL)	194,7±319,1	294,0±929,7	455,0±837,4	56,3±76,0	41,6±55,2	0-300
Neutrófilos (cél/μL)	4.860,7±2.840,1	6.905,0±3.087,7	6.859,4±6.577,3	6.975,6±2.448,1	6.703,3±1.942,5	3.000-11.500
Linfócitos (cél/μL)	1.607,8±920,6	2.380,2±995,3	1.910,1±1.441,7	2.365,6±1.918,4	2.281,2±1.141,6	1.000-4.800
Eosinófilos (cél/μL)	1.446,1±1.663,0	450,2±724,3	1.208,7±1.066,0	636,3±669,1	1.044,1±739,6	100-1.250
Monócitos (cél/μL)	706,6±459,8	704,7±238,2	818,2±455,7	829,4±372,5	679,8±328,1	150-1.350
Plaquetometria (x10 ³ /μL)	73±58	285±133	112±80	231±64	355±114	175-500

VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; HCM: Hemoglobina corpuscular média; RDW: Largura de distribuição das células vermelhas.

Antes do tratamento, D1, os valores de Hematócrito (Ht) e Hemoglobina (Hb) demonstraram diferença estatística quando se comparou G3 com G1 e G2 ($p < 0,0001$), os cães do G1 e G2 revelaram valores médios (Tabela 4) abaixo da normalidade. Os animais do G2 no D2 mantiveram os valores de Hb e Ht abaixo da referência e diferiram estatisticamente do G3 ($p = 0,02$) e do G1 ($p = 0,03$), respectivamente. Os animais do G1 retornaram aos valores normais no D2. Houve diferença significativa entre D1 e D2 em cada grupo tratado, com Hb ($p = 0,003$) e diferença altamente significativa para Ht ($p < 0,0001$). Houve diferença no volume corpuscular médio (VCM) entre G3 e G2 ($p = 0,006$), entretanto, a média do G2 manteve-se dentro da normalidade.

Tabela 4: Média e desvio-padrão dos valores bioquímicos dos cães pertencentes aos grupos monoinfectados (G1), coinfectados (G2) e controle (G3).

	Monoinfectados - G1		Coinfectados - G2		Controle - G3	Referência
	D1	D2	D1	D2		
FA(U/L)	89,9±52,5	51,8±45,9	309,0±614,3	73,6±17,4	68,9±24,4	0-160
Ureia(mg/dL)	19,8±18,4	20,2±7,1	36,8±46,2	21,6±6,6	22,3±13,7	20-56
Creatinina (mg/dL)	1,4±1,4	1,1±0,2	1,1±0,3	1,1±0,3	1,1±0,2	0,5-1,5
Cálcio(mg/dL)	11,3±3,5	10,8±2,3	11,0±1,5	9,8±2,1	10,4±1,1	9,7-11,3
Fósforo(mg/dL)	4,5±1,2	4,7±0,9	5,4±1,3	5,2±1,1	4,4±1,7	2,6-6,2
GGT(U/L)	6,5±3,8	5,2±4,2	15,0±33,3	7,7±6,6	14,7±11,5	0-25
ALT(U/L)	92,0±65,3	50,0±18,3	116,8±114,3	49,1±24,5	54,1±21,4	0-110
AST(U/L)	59,3±31,1	39,0±16,9	83,1±98,8	45,1±20,6	33,7±8,4	0-100
Fibrinogênio (mg/dL)	380,0±193,2	460±209,8	462,5±282,5	300±129,1	255±134,3	100-500
Albumina(g/dL)	2,2±0,4	2,6±0,4	2,0±0,6	2,6±0,5	2,7±0,2	2,3-3,1
PS (g/dL)	6,1±2,1	6,5±1,2	6,4±1,7	5,7±0,7	5,9±0,7	5,4-7,5
Globulina(g/dL)	3,8±2,2	3,8±1,5	4,4±2,0	2,9±0,9	3,2±0,8	2,7-4,4

D1: antes do tratamento; D2: depois do tratamento; FA: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil-transferase; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartatoaminotransferase; PS: Proteína sérica.

Em relação às células da linhagem leucocitária foi observada diferença estatística nos animais do G1 em relação aos valores de eosinófilos ($p=0,0004$) e no G2 presença de desvio nuclear de neutrófilo à esquerda regenerativo leve (DNNE), devido ao aumento do número total de neutrófilos bastonetes ($p=0,005$) no D1. No D2 os valores dos eosinófilos do G1 e de bastões do G2 voltaram aos valores de referência.

A média dos valores médios das plaquetas, no D1 do G1 foi de $72.700/\mu\text{L}$, enquanto a do G2 foi de $96.000/\mu\text{L}$ e diferiram estatisticamente do G3 ($p<0,0001$). Os valores médios do número de plaquetas no D2, tanto do G1 quanto do G2 retornaram a normalidade, apresentando médias de $284.920/\mu\text{L}$ e $231.286/\mu\text{L}$ respectivamente, com diferença altamente significativa ($p<0,0001$).

Os valores avaliados na bioquímica sérica, no D1 dos cães do G2 apresentaram valores médios (Tabela 4) maiores que os valores de referência na atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA), com diferença estatística antes e após o tratamento ($p = 0,02$) e alanina aminotransferase (ALT) ($p = 0,01$). No D2 as médias das enzimas, ALT e FA do G2 retornaram aos valores de referência.

No D1, os animais do G1 e G2 apresentaram diferença estatística, com menores valores da albumina sérica, em relação ao G3 ($p=0,01$), os cães do G2 demonstraram valores médios abaixo da referência. No D2 as médias dos valores séricos de albumina normalizaram, e também apresentaram diferença estatística, entre os grupos, antes e após o tratamento ($p = 0,003$).

6.6. Discussão

A observação dos hemoparasitos em lâmina estavam de acordo com os resultados da nPCR, demonstrando alta especificidade desta técnica. Entretanto, 13/18 cães que foram considerados positivos para hemoparasitose pela detecção de DNA de, pelo menos, um agente pela nPCR. Não foi possível demonstrar sua observação em lâmina, evidenciando baixa sensibilidade desta técnica, os achados do presente estudo se assemelham aos de Konklieng et al. (2014).

Após os 28 dias de tratamento com o cloridrato de doxiciclina, todos os cães infectados por *E. canis*, negativaram para este hemoparasito. Além disto, esta droga foi capaz de impedir possíveis infecções pelo mesmo parasito durante todo o período do estudo. Estes resultados corroboram com os achados de Gaunt et al. (2010) que demonstraram a eficácia da doxiciclina em negativar os cães com erliquiose canina.

A doxiciclina neste estudo não impediu que os cães permanecessem infectados ou se re-infectassem por *B. canis vogeli* e/ou *A. platys*. Estes dados foram divergentes dos resultados encontrados por Niwetpathomwat (2006) onde a doxiciclina foi capaz de negativar os cães com babesiose e de Gaunt et al. (2010), que demonstraram a eficácia da doxiciclina em cães infectados com *A. platys*.

Uma análise dos dados deste estudo permitiu observar que 6/18 (33,3%) dos cães que iniciaram o estudo sem apresentarem detecção de DNA de *A. platys*, e após o tratamento com doxiciclina revelaram-se positivos por este agente. Estes resultados juntamente com as descrições de De Tommasi et al. (2013) que a *A. platys* pode infectar células pertencentes a medula óssea como megacariócitos e promegacariócitos e Lanza-Perea et al. (2014) que descreveram que amostras obtidas a partir de medula óssea de cães infectados com *A. platys* amplificaram mais frequentemente o patógeno do que em amostras de sangue periférico. Pode-se sugerir que a medula óssea, pode servir como um local de persistência destes patógenos. No presente estudo não utilizou-se a medula óssea como alvo de detecção de hemoparasitas. Desta forma é possível que em alguns

cães *A. platys* estivesse presente somente na medula óssea e que após o tratamento com doxiciclina estes parasitos tenham ido para corrente sanguínea. De acordo com relatos de Gaunt et al. (2010), quando a *A. platys* encontrava-se em coinfeção com a *E. canis*, é observada maior persistência da *A. platys* do que quando presente como monoinfecção, desta forma, é possível ainda que seja necessário prolongar o tempo de tratamento dos cães coinfectados com *A. platys* e *E. canis* para que se obtenha sucesso na negatificação parasitológica destes pacientes. Entretanto, mais estudos são necessários.

Dos cães infectados 8/18 (44,5%) encontravam-se coinfectados, e manifestaram sinais clínicos e análises laboratoriais com alterações mais intensas que os monoinfectados, além de revelar alta taxa de coinfeção nos animais da região, estes dados servem de alerta para os médicos veterinários, e se assemelham a De Tomasi et al. (2013) que descreveram em cães naturalmente coinfectados exacerbação da apresentação clínica e laboratorial.

Quanto as alterações hematológicas no D1 foi possível verificar que 94,4% dos cães de G1 e G2 apresentaram anemia e 58,8% dos cães infectados apresentaram anemia normocítica hipocrômica que de acordo com De Castro et al. (2004); Witter et al. (2013), Antognoni et al. (2014) e Santamaria et al. (2014) a anemia é uma das alterações mais comumente observadas em cães com hemoparasitos. Os resultados deste estudo diferem de Borin et al. (2009); Antognoni et al. (2014) que a anemia mais comumente observada pela infecção destes dois patógenos é a normocítica normocrômica.

Valores de hematimetria (Hm), Hb e Ht também foram abaixo da normalidade nos cães do presente estudo, estes resultados se assemelham aos de Suddhakara et al. (2016) que demonstraram diminuição na contagem total de eritrócito em cães com babesiose e de Bhadesiya e Raval (2015) que encontraram em seus estudos diminuição de Ht em cães com erliquiose, mas divergem nos valores de Hb.

O presente estudo concorda com Harrus et al. (1997) que a diversificação dos parâmetros hematológicos dos cães infectados com hemoparasitos, pode ser creditado a fase clínica em que os cães se encontram, o que pode ter ocorrido no presente estudo.

Antes do tratamento ambos os grupos apresentaram valores médios de plaquetas menores que em cães saudáveis, e corrobora com achados de Bulla et al. (2004); Eichenberg et al. (2016); Nair et al. (2016) que demonstraram presença de trombocitopenia em cães infectados por diferentes hemoparasitos, e de Bouzouraa et al. (2016) que este é a principal alteração laboratorial descrito em cães com *A. platys*.

No presente estudo, os cães demonstraram alterações leucocitárias com presença de eosinofilia no G1 e de DNNE leve no G2. Entretanto, estas alterações leucocitárias não são comumente relatadas na literatura em cães com hemoparasitose, pois, conforme Moreira et al. (2003) é mais frequente a presença de leucopenia. O que deve ser levado em consideração nessa divergência, no que se referem às mudanças na leucometria de cães parasitados, é o fato de estarem infectados experimentalmente ou com infecções naturais. Nos casos naturais, Gianopulos et al. (2016) reportaram que não foi possível estabelecer padrões característicos da doença, na mudança dos perfis de leucócitos, demonstrando assim uma grande variedade de resposta natural frente a infecção.

Os animais do G1 retornaram aos valores de normalidade após o D2 e embora a média da Hb e do Ht do G2 tenham aumentado no D2, ainda se mantiveram abaixo dos valores de referência,

assemelhando-se aos resultados de Rojas et al. (2014), que demonstraram maior gravidade em relação a anemia quando compararam cães com mono e coinfeção por diferentes hemoparasitos.

Os valores bioquímicos séricos avaliados no D1 dos cães do G2 apresentavam valores médios maiores que os valores normais para a atividade das enzimas FA e ALT. De acordo com Stockham e Scott (2011), a ALT é uma enzima citoplasmática e seu aumento sérico é o principal indicador de lesão de hepatócitos nos cães, ao considerar os valores do presente estudo antes do tratamento juntamente com aumentos da FA se assemelham aos resultados de Costa et al. (2015) que demonstram a presença de alterações hepáticas em cães coinfectados por *A. platys* e *E. canis*. Após o tratamento com a doxiciclina houve o retorno dos valores à normalidade das enzimas hepáticas ALT e FA dos cães do G2.

Quanto aos valores de albumina, os cães do grupo G2, no D1 apresentaram diferença estatística e menores valores em relação ao G3 semelhantes aos encontrados por Costa et al. (2015) em animais coinfectados, mas as médias dos valores séricos de albumina se normalizaram no D2

Os autores deste trabalho propõem a terapia com a doxiciclina que contribuiu para a melhora dos cães, pois, como descreveu Tosta (1983) este antibiótico é considerado um quimioterápico com ação imunoestimulante, desta forma, apesar de a doxiciclina não ter sido capaz de negatizar os cães para todos os hemoparasitos, se mostrou eficaz em promover melhora clínica e laboratorial. Assim, sua utilização pode ser recomendada para um tratamento inicial até o recebimento dos resultados das análises complementares, como a nPCR, visto a alta taxa de cães coinfectados nesta região.

Apesar de parte dos cães do G1 e G2 encontrarem-se infectados ou reinfectados mesmo após o tratamento com doxiciclina no D2, observou-se melhora clínica e laboratorial de todos os cães do G1 e parte dos cães do G2, o que sugere que independente do estado de infecção, a doxiciclina contribuiu para a melhora observada, sozinha ou complementada pela negatização da *E. canis* considerada por Costa et al. (2015) que apresenta maior patogenicidade quando comparado a outros hemoparasitos.

6.7. Conclusão

As coinfeções são frequentes na região estudada e apresentam manifestações clínicas e laboratoriais mais intensas que nos cães monoinfectados.

O tratamento com doxiciclina foi efetivo para a melhora clínica e laboratorial dos cães monoinfectados com *Ehrlichia canis*.

A doxiciclina não foi efetiva para negatizar os cães com babesiose e anaplasnose, mas auxiliou na melhora clínica e laboratorial dos cães.

6.8. Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANTOGNONI, M.T.; VERONESI, F.; MORGANTI, G.; et al. Natural infection of *Anaplasma platys* in dogs from Umbria region (Central Italy), *Vet. Ital.*, v. 1, p. 49-56, 2014.

- ARAÚJO, A.C.; SILVEIRA, J.A.G.; AZEVEDO, S.S.; et al. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 35, n. 5, p. 456-461, 2015.
- BHADESIYA, C.M.; RAVAL, S.K. Hematolobiochemical changes in ehrlichiosis in dogs of Anand region, Gujarat. *Vet. World*, v. 6, p. 713-717, 2015.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- BOUZOURAA, T.; RENÉ-MARTELLET, M.; CHÊNE, J.; et al. Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. *Ticks Tick Borne Dis.*, doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.07.004, 2016.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K., ARAÚJO, p. J.J., TRINCA, L.A., LOPES, R.S., WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet. Res.*, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.
- COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; COURA, F.M. et al. Bioquímica sérica de cães infectados por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Leishmania sp.* *Act. Sci. Vet.*, v. 43, 1261, 2015.
- DAGNONE, A.S.; DE MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. *Semina: Ci. Agrárias*, v. 22, n. 2, p. 191-201, 2001.
- DE CASTRO, M.B., MACHADO, R.Z., DE AQUINO, L.P, ALESSI, A.C., COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytia erlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.*, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.
- DE TOMMASI, A.S.; OTRANTO, D.; DANTA-TORRES.; et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/1756-3305-6-97, 2013.
- DRUMONT, M.R.S. Ocorrência, classificação e fatores de risco de anemias em cães. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.
- EICHENBERGER, R.M.; RIOND, B.; WILLI, B.; et al. Prognostic markers in acute *Babesia canis* infections. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 1, p. 174-182, 2016.
- GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B.; et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic serologic and molecular findings. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/1756-3305-3-33, 2010.
- GIANOPOULOS, A.; MYLONAKIS, M.E.; THEODOROU, K.; et al. Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 2, p. 281-290, 2016.
- HARRUS, S., KASS, P. H., KLEMENT, E., WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Vet. Rec.*, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.
- JAIN N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

- KANEKO J.J.; HARVEY J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
- KAWAHARA, M.; RIKISHISA, Q.; LIN, E. et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 72, p. 1102–1109, 2006.
- KONGKLIENG, A.; THANCHOMNANG, T.; INTAPAN, P. M.; et al. Detection of *Ehrlichia canis* in canine blood samples by real-time fluorescence resonance energy transfer (FRET) PCR and melting curve analysis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v. 5, p. 1149-1156, 2014.
- LANZA-PEREA, M.; ZIEGER, U.; QUROLLO, B.A.; et al. Intraoperative bleeding in dogs from Grenada seroreactive to *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 28, n. 6, p. 1702-1707, 2014.
- LASTA, C.S.; DOS SANTOS, A.P.; MESSICK, J. B.; et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 22, n. 3, p. 360-366, 2013.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, J.H.; OWENS, W.L.; et al. Nested PCR assay for the detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 1090–1095, 1998.
- MOREIRA, S.M., BASTOS, C.V., ARAÚJO, R.B., SANTOS, M., PASSOS, L.M.F. Estudo retrospectivo (1998-2001) em erliquiose canina em Belo Horizonte, MG, Brasil, *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.
- NAIR, A.D.; CHENG, C.; GANTA, C.K et al. Comparative experimental infection study in dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS One*, e0148239, 2016.
- NEER, M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T. et al. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM* *J. Vet. Intern. Med.*, v. 16, p. 309-315, 2002.
- NIWETPATHOMWAT, A.A retrospective study of the therapeutic efficacy of doxycycline on concurrent canine ehrlichiosis and babesiosis in a veterinary hospital population. *Comp. ClinPathol.*, v. 15, p. 215-219, 2006.
- ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V. et al. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesiavogeli* and *Hepatozooncanis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.*, v. 199, n. 3-4, p. 121-128, 2014.
- SANTAMARIA, A.; CALZADA, J.E.; SALDAÑA, A.; et al. Molecular diagnosis and species identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in dogs from Panama, Central America. *Vet. Borne Zoon. Dis.*, v. 14, n. 5, p. 1-3, 2014.
- SCHALM, O.W.; SMITH, R.; KANEKO, J.J. Plasma protein: fibrinogen ratios in dogs, cattle and horse. Part 1. Influence of age on normal values and explanation of use in disease, *Calif. Vet.*, v. 24, p. 9-11, 1970.
- SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; RIBEIRO, M.F. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazamagouazoubira*) and marsh

- deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 177, n. 1-2, p. 61-66, 2011.
- STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Fundamentos de patologia clínica veterinária. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011, 729p.
- SOUSA, V.R.F.; ALMEIDA, A.B.P.F.; BARROS, L.A.; et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Cienc. Rural*, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.
- SUDHAKARA, R.B.; SIVAJOTHI, S.; VARAPRASAD, R.L.S., et al. Clinical and laboratory findings of Babesia infection in dogs. *J. Parasit. Dis.*, v. 2, p. 268-272, 2016.
- TAMURA, K.; STECHER, D.; PETERSON, A.; FILIPSKI, S.; KUMAR, M. MEGA 6. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Biol. Evol.*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TOSTA, C.E. Modificação da resposta imune por agentes quimioterápicos. *Res. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 16, p. 3-5, 1983.
- VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.
- WITTER, R.; VECCHI, S.N.; PACHECO, T.A.; et al., Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmo setrombocítica em cães suspeitos de hemoparasitoses em Cuiabá, Mato Grosso. *Semin.: Cienc. Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 3811-3822, 2013.
- ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; et al. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.* V.89, p. 241-248, 2000.

7. ARTIGO 4 - BIOMARCADORES RENAIIS EM CÃES INFECTADOS COM DIFERENTES HEMOPARASITOS

Renal biomarkers in dogs infected with different hemoparasites.

7.1. Resumo

Objetivou-se avaliar a função renal, de cães naturalmente mono e coinfectados, por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Leishmania chagasi*. As análises bioquímicas urinárias foram realizadas por meio da relação proteína/creatinina (UPC), gama glutamiltransferase/creatinina (gGTU/CrU) e na atividade da enzima gama glutamiltransferase (gGTU), antes e após tratamento com doxiciclina. Com UPC >0.5, antes do tratamento no grupo G2 (monoinfectado) houve 30% dos cães e no G3 (coinfectados) 66,7% indicando proteinúria. Após o tratamento, com exceção de um cão monoinfectado, os demais retornaram com os valores da UPC a normalidade. Quanto a atividade da gGTU no G2, um cão e no G3 33,3% apresentaram valores elevados, antes do tratamento e normalizaram após 28 dias de doxiciclina. A relação gGTU/CrU nos cães do G2 30% mostraram valores elevados com retorno a normalidade. No G3 55,6%, apresentaram valores acima da média e 28,6% mantiveram valores elevados após o tratamento. Em relação à creatinina sérica, mesmo após antibioticoterapia, um cão do G2 manteve-se com valor elevado. Considera-se que os biomarcadores urinários, avaliadas no presente estudo, UPC, gGTU e gGTU/CrU mostraram-se elevados antes do tratamento de acordo com a gravidade da infecção. Após 28 dias de antibioticoterapia, houve redução dos valores de cada biomarcador avaliado. O tratamento foi capaz de negativar a *E. canis*, uma das doenças de elevada importância médico veterinária, pela frequência na sua ocorrência.

Palavras-chave: biomarcadores renais, proteinúria, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Canis familiaris*.

7.2. Abstract

The present study aimed to evaluate the kidney function of dogs naturally single infected or co-infected by *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis* and *Leishmania chagasi*. Biochemical analysis comprised protein and creatinine ratio (UPC), gamma glutamyl transferase and creatinine ratio (gGTU/CrU) and gamma glutamyl transferase activity (gGTU), before and after treatment with doxycycline. UPC >0.5 before treatment was observed in 30% of G2 dogs (single infected) and 66,7% of G3 dogs (co-infected), suggesting proteinuria. After treatment, except one single infected dog, all others had UPC values reverting to normality. Concerning to gGTU activity, one dog in G2 and 33.3% of G3 dogs presented increased values before treatment and reverted to normal values after 28 days of treatment with doxycycline. GTU/CrU ratio also was high in 30% of G2 dogs and returned to normal. In G3, 55.6% of dogs had values above average and 28.6% maintained high after treatment. One G2 dog kept serum creatinine high after treatment. Urinary biomarkers UPC, gGTU and gGTU/CrU evaluated in the study presented increased levels before treatment according the severity of the infection. After 28 days of antibiotics each biomarker analyzed had their values back to normal. The therapy was able to negativate serology to *E. canis*, one of most relevant disease in small animals veterinary medicine, due to its prevalence.

Keywords: renal biomarkers, proteinuria, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Canis familiaris*.

7.3. Introdução

Na fase subclínica e crônica da erliquiose monocítica canina há teoria de estímulo constante do sistema imune, o que desencadeia glomerulonefrite induzida por deposição de imuno complexos, com alterações renais silenciosas que evoluem para doença renal terminal (Silva et al., 2015). Nas apresentações atípicas de *Babesia gibsoni* as lesões renais podem estar presentes devido à presença de proteinúria, por doença glomerular imunomediada (Slade et al., 2011), e por depósitos multifocais de IGM demonstrados por imunohistoquímica nas artérias inflamadas e glomérulos renais, devido a uma intensa imunoestimulação (Wozniak et al. 1997).

Na última década, o campo emergente da proteômica clínica revigora esperança de identificar novos biomarcadores no plasma e urina para caracterizar causa e curso de lesão renal (Siew et al., 2011). A demanda por testes e marcadores para detectar estágios iniciais da injúria renal vem impulsionando o estudo de novas ferramentas diagnósticas. Na medicina, a aplicação experimental de diversos biomarcadores já é realidade, mas, na medicina veterinária o alto custo dos ensaios, carência de reagentes espécie-específicos representam grandes entraves. Alguns biomarcadores renais como N-acetil-beta-d-glicosaminidase (NAG), γ -glutamyl-transpeptidase urinária (GGTU), Fosfatase alcalina urinária (FAu) e Cistatina C, já vem sendo estudados na medicina veterinária (Castro et al., 2016).

A avaliação da função renal também pode ocorrer pela variação percentual dos níveis urinários da gGT, assim como a relação proteína urinária/creatinina urinária (UPC), são métodos efetivos para detectar alterações da função renal (Amaral, 2016), e a relação gama glutamiltransferase e creatinina (gGTU/CrU) em urina recém-coletada é uma ferramenta rápida e de baixo custo para identificar cães com proteinúria tubular (Ibba et al., 2016)

Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações renais de cães infectados com diferentes hemoparasitos por meio de biomarcadores renais antes e após tratamento com doxiciclina.

7.4. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal, da Universidade Federal do Espírito Santo - ES, sob o número 047/2015.

Dos cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, ES, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelos seus tutores, foram incluídos no presente estudo 24 cães maiores de um ano de idade, independentes de raça e sexo. Os cães passaram por exame clínico e foram selecionados por apresentarem pelo menos três critérios clínicos e/ou laboratoriais compatíveis com hemoparasitose (Neer et al., 2002). Após a realização da identificação dos hemoparasitos pela técnica nested PCR (nPCR), os cães foram subdivididos em grupos, onde: G1 foi composto por seis cães que encontravam-se doentes e PCR negativo, G2 com dez cães doentes e PCR positivo para, pelo menos, um dos hemoparasitos pesquisados (monoinfectados), G3 com oito cães doentes e PCR positivo para, pelo menos, dois dos hemoparasitos pesquisados (coinfectados) e G4 com dez cães hígidos da mesma região e PCR negativos para todos os hemoparasitos pesquisados.

Foram coletados 5,0 mL de sangue por punção da veia cefálica e/ou jugular, armazenados em tubos estéreis sem anticoagulante BD Vacutainer®, para obtenção do soro que foi usado para análises de bioquímicas séricas realizadas de acordo com Kits comerciais da marca Labtest Diagnóstica S.A., pelo analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS 2000). Os valores de referência utilizados estão de acordo Kaneko et al. (1997)

Parte do sangue, 2,0 mL foi armazenada em microtubos VACUPLAST® com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 10%, para análises moleculares: o DNA foi extraído a partir de 300µL de sangue de cada cão, com o Kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. A PCR foi realizada pelas técnicas convencionais e nested PCR (nPCR). Utilizou-se uma alíquota do primeiro produto de PCR amplificado para a segunda reação de nPCR. Os iniciadores foram utilizados para detectar: *Babesia* spp, *Hepatozoon* sp. e membros da família Anaplasmataceae que infectam monócitos, granulócitos e plaquetas, descrito por Silveira et al. (2011).

Os produtos da amplificação da PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1% (40 min, 100 V), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras positivas foram purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Biotecnologia Brasil, São Paulo, Brasil) conforme o fabricante. E sequenciadas com o Applied Biosystems modelo ABI3130 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o Applied Biosystems BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (v.3.1), com o polímero POP-7™ como matriz de separação e os primers utilizados na reação de PCR. As sequências foram alinhadas, editadas e analisadas utilizando MEGA 6.0 (Tanura et al., 2013). A identidade de cada sequência foi confirmada por comparação com as sequências disponíveis no GenBank com auxílio do software BLAST (Altschul et al., 1990).

Com a realização da técnica nested PCR (nPCR) foram identificados a presença de *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*. A identificação da *Leishmania chagasi* foi pela observação em lâmina de amastigotas em citologia de medula óssea. Desta forma, os cães foram separados em G1: cães PCR negativos e doentes. G2: cães PCR positivos e monoinfectados com *E. canis*, *B. canis vogeli* ou *A. platys* isoladamente. G3: cães PCR positivos para *E. canis* e coinfectados com *B. canis vogeli* ou *A. platys* e um cão coinfectado com *Hepatozoon canis* e *Leishmania chagasi* e o G4: grupo controle formado com cães clínica e laboratorialmente saudáveis.

Para urinálise coletaram-se 10 mL de urina por cistocentese, divididos em duas alíquotas para a urinálise e mensuração dos parâmetros bioquímicos urinários. A urinálise foi realizada, no máximo uma hora após a coleta e foram analisadas por meio do exame físico (cor, aspecto, odor e pH), e a densidade com o auxílio do refratômetro manual. Para o exame químico utilizou-se tiras reagentes Uriquest Plus Vet® e a sedimentoscopia ocorreu após a centrifugação (Spinlab®) com análise do precipitado em microscopia de luz (Olympus® CX40).

Para mensuração dos parâmetros bioquímicos urinários, as urinas foram refrigeradas entre 4°C e 8°C, e no máximo 24 horas após a coleta foram analisadas com Kits comerciais da marca Labtest Diagnóstica S.A, conforme normas do fabricante, com o analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS® 2000). Os parâmetros analisados foram: ureia urinária, proteína urinária, creatinina urinária, relação proteína urinária/creatinina urinária (UPC) por divisão simples entre seus valores. Atividade urinária das enzimas fosfatase alcalina (FAu) e gama glutamiltransferase

(GGTu). De acordo com De Schepper et al. (1989) utilizou-se a correção da GG Tu para uso de amostra única de urina em todos os cães.

Todos os cães do G1, G2 e G3 receberam como tratamento o cloridrato de doxiciclina, na dose de 10 mg/kg SID por 28 dias, como droga única. A droga é referenciada como efetiva para diferentes hemoparasitos (Neer et al., 2002; Niwetpathomwat, 2006; Gaunt et al., 2010). Os cães foram avaliados nos momentos (D1) antes e após o tratamento (D2). Os cães do G4 não receberam o antibiótico por estarem saudáveis.

Os resultados foram analisados por ANOVA, Fisher e ad-hoc Tukey, para densidade urinária. Nos demais parâmetros foram aplicados o teste de Kruskal-Wallis para comparação do perfil de infecção ou Mann-Whitney, antes e depois do tratamento. A correlação de Spearman foi utilizada na urinálise. Todos os testes foram aplicados no Programa Graph Pad Prism.

7.5. Resultados e discussão

Neste trabalho ficou evidenciado que os cães coinfectados desenvolvem maior número e mais intensos sinais clínicos que os monoinfectados isoladamente e dos cães doentes, mas com outras afecções (Figura 5). Os sinais clínicos apresentados são semelhantes aos observados na erliquiose monocítica canina, no curso da fase aguda (Harrus et al., 1997).

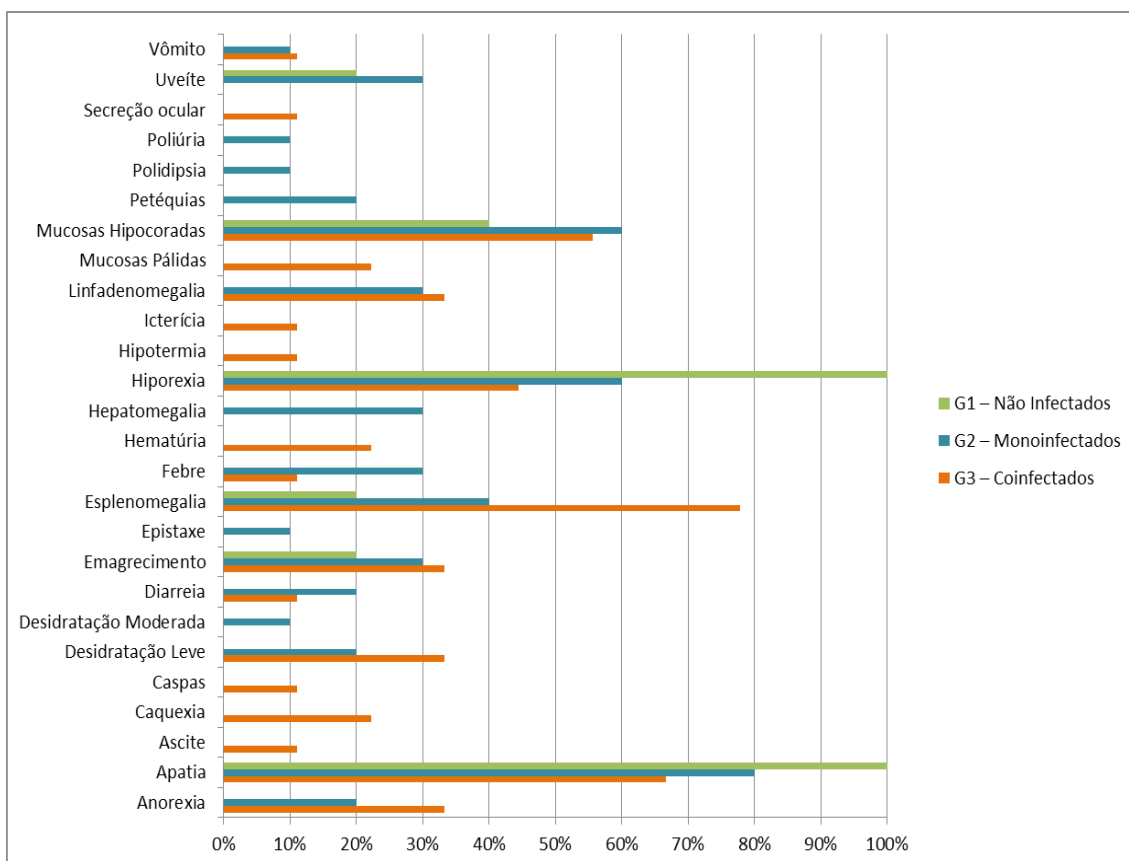


Figura 5: Alterações clínicas observadas nos cães doentes não hemoparasitados (G1), cães monoinfectados (G2) e cães coinfetados (G3).

Os sinais clínicos observados nos cães coinfetados com *Babesia canis vogeli*, se assemelham a descrição de Kules et al. (2016) que a babesiose canina, quando grave, pode lesionar órgãos e tecidos como o fígado, rins, pulmões, pâncreas e músculos e Sudhakara et al. (2016) hiporexia, desidratação, palidez de mucosas, febre, linfadenopatia, mucosas ictéricas, presença de vômito e diarreia; Nalumba et al. (2015) anorexia, letargia e perda de peso. Os sinais observados nos cães que foram a óbito estão de acordo com os relatos de Rafaj et al. (2013) e Kules et al. (2016) que a gravidade da infecção nos cães pode variar, sendo associados à síndrome da resposta inflamatória sistêmica, distúrbios no sistema de coagulação e síndrome da disfunção múltipla dos órgãos, possível causa do óbito do cão do grupo de coinfetados deste estudo e com a sugestão de Ramsey (2012) que a doença pode se manifestar na forma crônica ou subclínica, aguda e hiperaguda.

Em relação aos sinais clínicos do cão com hepatozoonose, não foi possível relacionar isoladamente, visto que se apresentava coinfetado com *Leishmania chagasi*, e que para Kelly et al. (2013) e Harvey et al. (2016) a maioria dos animais infectados com *H. canis* encontra-se sem si-

nais clínicos da doença, e são classificados como assintomáticos, porém nos animais com sintomas Gondim et al. (1998); Mundim et al. (2008) e Chhabra et al. (2013) reportaram a presença de anorexia, mucosas pálidas, apatia, hipertermia, prostração, diarreia, perda de peso, vômitos, poliúria, polidipsia. O cão com leishmaniose apresentou os sinais descritos por (GENARO, 1993) como febre, anemia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e perda progressiva de peso evoluindo para caquexia.

A doxiciclina usada nos cães deste estudo mostrou-se efetiva na melhora dos sinais clínicos e laboratoriais, principalmente na negativação da *E. canis* determinada pela nPCR, esta escolha também se baseou em Lynn et al. (1978) que consideraram a doxiciclina um antibiótico seguro, com amplo espectro de ação, sem nefrotoxicidade, porque sua via de excreção principal é extrarrenal, e Curtis (1972) a descreveu útil como antibiótico de amplo espectro em pacientes com lesão renal e Stenbaek, Myhre, Berdal, (1973) reportaram que não interfere nos níveis da ureia e creatinina sérica.

Nos cães coinfectados G3 (Tabela 5), o valor médio da UPC foi de 0.60 ± 0.43 antes do tratamento (D1), no entanto, nesse grupo havia um cão com infecção alóctone de *Hepatozoon canis* e *Leishmania chagasi* e o outro coinfectado com *E. canis* e *B. canis vogeli* autóctone, e ambos foram a óbito na primeira semana do início do experimento. Após o tratamento (D2), a relação UPC do G3 reduziu para (0.15 ± 0.06) . Nos cães do G2 os valores médios para UPC no D1 foi de (0.50 ± 0.42) e no D2 de (0.20 ± 0.21) ; o valor da UPC para os cães do G1, no D1 (0.47 ± 0.45) e D2 (0.14 ± 0.20) e nos cães saudáveis do grupo G4, o valor da UPC foi de (0.22 ± 0.15) .

Tabela 5: Valores mínimos e máximos, com média e desvio padrão (DP), da relação proteína/creatinina urinária (UPC), atividade urinária da gama glutamil transferase (gGTU), relação atividade urinária da glutamiltransferase/creatinina urinária (gGTU/CrU), atividade urinária da fosfatase alcalina (FAU), creatinina sérica (Cr soro), densidade urinária (Densidade) dos grupos, dos cães doentes não hemoparasitados (G1), cães mono infectados (G2), cães co infectados (G3) e cães saudáveis do grupo controle (G4), antes e depois do tratamento.

			G1	G2	G3	G4
UPC	Média± DP	Antes	0.47±0.45	0.50±0.42	0.60±0.43	0.22±0.15
		Depois	0.14±0,20	0.20±0.21	0.15±0.06	
	Mín/Máx	Antes	0.04 - 1.06	0.09 -1.23	0.06-1.47	0.06-0.45
		Depois	0.04 - 0.50	0.04 -0.72	0.08-0.26	
gGTU	Média± DP	Antes	36.60±34.68	54.7±45.1	98.44±79.7	67.90±59.2
		Depois	31.00±15.15	31.9±18.1	33.29±22.9	
	Mín/Máx	Antes	8.00 - 82.00	12.0-169.0	9.00-218	26.0-188.0
		Depois	14.00 - 49.00	14.0-72.0	15.00-74.00	
gGT/CrU	Média± DP	Antes	0.16±0.13	0.29±0.18	0.96±1.00	0.40±0.35
		Depois	0.15±0.08	0.17±1.19	0.35±0.32	
	Mín/Máx	Antes	0.02-0.34	0.03-0.62	0.05-2.60	0.95
		Depois	0.09-0.25	0.05-0.37	0.05-0.92	
FAU	Média± DP	Antes	17.84 ±10.9	102.3±264.20	31.07±25.9	128.58±180.1
		Depois	15.86 ± 6.92	33.71±28.75	24.29±26.7	
	Mín/Máx	Antes	8.00 – 33.00	8.00-854.00	7.00-42.00	16.0-531.0
		Depois	9.00 - 24.80	8.00-83.00	7.00-8300	
Densidade	Média± DP	Antes	1.058±0.03	1.045±0.02	1.043±0.02	1.042±0.02
		Depois	1.038±0.023	1.047±0.009	1.041±0.01	
	Mín/Máx	Antes	1.032–1.099	1.012-1.070	1.024-1.088	1.018-1.068
		Depois	1.008- 1.072	1.024-1.056	1.014-1.054	
Cr soro	Média± DP	Antes	1.08±0.19	1.44±1.40	1.11±0.35	1.05±0.20
		Depois	1.30±0.20	1.14±0.24	1.09±0.27	
	Mín/Máx	Antes	0.90-1.40	0.70-5.40	0.50-1.50	0.60-1.30
		Depois	1.10-1.50	0.90-160	0.70-1.40	

Na análise da Tabela 5 se observou que após a administração da doxiciclina houve redução dos valores da UPC em todos os grupos tratados, com diferença significativa (p=0.0006) entre os

grupos nos momentos D1 e D2. Os valores médios apresentados são semelhantes aos resultados de Bonfanti et al. (2004) com valores para UPC de 0,37, intervalo de (0.11-2.24) e referência de 0,7 em cães expostos a agentes infecciosos como a *L. infantum*, *E. canis* e *B. canis*, mas, sem qualquer perturbação renal estrutural ou funcional.

É importante notar que a mudança nos valores deste biomarcador urinário, na maioria dos animais, está correlacionada com a gravidade da doença, isto é, quanto mais coinfestado, maiores foram os valores de UPC. De todos os grupos, se forem considerados os valores da UPC como recomendaram IRIS (2015), identifica-se que no G1 2/5, no G2 3/10 e no G3 6/9 os cães apresentaram valores da UPC > 0.5, independente dos valores de creatinina sérica, assim,

O G2 3/10 (30%) e no G3 6/9 (66,7%) mostraram cães com proteinúria (UPC >0.5); e no G2 5/10 e no G3 1/9 cães com microalbuminúria (UPC = 0.2 a 0.4) de acordo com IRIS (2015). Estes resultados estão de acordo com Lobetti e Jacobson (2001) que demonstraram a proteinúria como achado comum em cães com babesiose, e mais evidente em cães com doença de maior gravidade, como ocorreu neste estudo com os cães do G3. Esta constatação mostra a UPC como uma análise laboratorial rápida, de custo baixo, mas de grande auxílio para o médico veterinário na tomada de decisão, principalmente para preservação de órgãos vitais, como os rins.

Os resultados da UPC do presente estudo concordam com as análises de Herring et al. (2014) que observaram UPC >0,5 em 55% de cães com diabetes mellitus resultado que auxiliou na instituição de tratamento adequado para a cães com valores de UPC mais elevados e mostraram redução dos valores da proteinúria com melhora dos sinais clínicos. Smets et al. (2010) sugeriram que o aumento da UPC em cães com DRC reflete resposta inflamatória com consequente passagem de proteína de alto peso molecular pela barreira glomerular danificada.

Após o tratamento, os valores da UPC dos cães retornaram a normalidade, com exceção de um cão do G2 que mostrou redução na eliminação de proteína urinária, e com melhora clínica. O cão do G3 que apresentou maior valor para a UPC no D1, não completou o tratamento e foi a óbito, o que pode sugerir a utilização dos valores elevados da UPC como marcador prognóstico.

O valor médio da atividade urinária da gGT no grupo G3 foi de (98.44±79.7U/L) no D1 e de (33.29±22.9U/L) após antibioticoterapia (p=0,03). Estes valores se mostraram maiores que nos outros grupos experimentais, pois no G1 no D1 foi de (36.60±34.68U/L) e depois 31.00±15.15 U/L; no G2 no D1 (54.7±45.1U/L) e no D2 (31.9±18.1U/L) e G4 com valor da atividade urinária da gGT de (67.90±59.2U/L).

Os valores médios obtidos de gGTU para os cães do grupo G3 coinfestados estavam elevados antes do tratamento, pois, baseado na descrição de De Schepper (1989) o intervalo de normalidade da atividade do gGTU é de 13U/L a 92 UI/L. Desta forma considera-se no presente estudo que os valores obtidos para a gGTU foi efetivo para diferenciar o estado renal dos pacientes hemoparasitados e tratados com doxiciclina, o que reforça a descrição de Smets et al. (2010) que a atividade urinária da gGT é um marcador de dano tubular, e Palacio et al. (1997) descreve que esse parâmetro é mais sensível e confiável para avaliar dano renal, como ocorreu na fase inicial na leishmaniose canina. Entre os grupos houve diferença estatística nos valores da gGTU do G1 no D2, em comparação com G3 no D2 (p=0.0144) e entre G1 no D2 e o G4 (p=0.0044), o que reforça a possibilidade de melhora do dano renal, após o tratamento.

Com a quantificação da atividade urinária da gGT e da mensuração da creatinina urinária foi possível determinar a relação da atividade de gGT na urina e a concentração da creatinina urinária.

ria (gGTU/CrU) cujos valores médios apresentados pelos diferentes grupos foram: para o grupo G1 no D1 (0.16 ± 0.13) e de no D2 (0.15 ± 0.08); G2 no D1 (0.28 ± 0.19) e no D2 (0.17 ± 0.10); G3 no D1 (0.96 ± 1.00) e no D2 (0.35 ± 0.32) e os cães controles do G4 (0.40 ± 0.35). Observa-se que cães coinfectados G3 apresentaram maior valor em comparação aos outros grupos, assim como Lobetti e Lambrechts (2000) observaram aumento significativo da relação em cães anestesiados e corrobora com recomendações de Ibba et al.(2016) que a relação gGTU/CrU, deve ser usado para melhorar o protocolo diagnóstico nesses animais. Estes autores ainda descrevem que em cães com leishmaniose visceral, valores aumentados da relação gGTU/CrU foi observado em cães com proteinúria tubular e mista, podendo ser utilizada como uma ferramenta rápida de indicação precoce de lesão renal.

Na análise dos valores obtidos para a atividade urinária da fosfatase alcalina (Tabela 5) não se observou uma constante na variação, entre os momentos experimentais, e concorda com os resultados de Kovalinka (2014) quando observaram diferentes variações nos valores urinários, para um mesmo insulto, desta forma seu uso é problemático em pacientes com múltiplas comorbidades, pois provavelmente sua expressão não é específica para o rim o que torna inviável para uso na rotina da clínica médica.

Quanto à urinálise, os resultados foram significativos em relação à proteinúria, na tira reagente, no D1, entre as urinas dos cães do grupo controle G4 e os outros grupos G1, G2 e G3 ($p=0.005$), onde a proteinúria na urina dos grupos antes e depois foi altamente significativo ($p<0.0001$) e foram semelhantes à presença de proteína pela UPC.

O valor da creatinina sérica não retornou a normalidade de 1.50mg/dL (Kaneko, 1997) em apenas um cão do G2 o que pode ter sido afetado pelo fator tempo, porque em 28 dias os valores apresentaram redução de 5.4mg/dL para 1.6mg/dL e alcançou a normalidade após 60 dias do tratamento. Este parâmetro isoladamente, ou em conjunto com as concentrações séricas de ureia é considerado padrão ouro para a avaliação da função renal, no entanto, o aumento destes analitos ocorrem de forma tardia, ou seja, quando 66 a 75% dos néfrons mostrarem incapacidade funcional como descrito por Freitas (2014). Por outro lado os biomarcadores avaliados pelo estudo demonstraram precocidade na avaliação de lesão renal, pois a maior parte dos cães não demonstraram aumento da ureia e creatinina.

Para que não haja progressão da doença renal de cães infectados com hemoparasitos, a utilização destes ensaios clínicos urinários pode auxiliar no diagnóstico e instituição do tratamento renoprotetor.

Os biomarcadores urinários avaliadas no presente estudo, UPC, gGT e gGTU/CrU mostraram antes da terapêutica, aumento de forma dependente da infecção, e com o tempo de tratamento exibiu sensibilidade ao mostrar a melhora clínica e laboratorial após 28 dias de antibioticoterapia.

7.6. Conclusão

Observa-se de modo geral, que ocorreu aumento de todos os parâmetros avaliados na urina de cães que formaram os grupos experimentais, antes do tratamento, e apresentaram melhora significativa, destas variáveis, após o término do uso do antibiótico. Esta mudança mostra que no grupo dos cães coinfectados, a presença de injúria renal, foi mais acentuada, entretanto, a maior parte retornou aos valores de normalidade, após o tratamento.

O presente estudo mostrou que a quantificação da gGT urinária, a relação gGT e creatinina urinária, em conjunto com a relação proteína/creatinina urinária e a urinálise são parâmetros de fácil execução e devem ser incluída na rotina de exames laboratoriais realizados para diagnóstico e prevenção de doença renal, nos cães com hemoparasitoses.

7.7. Referências

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.

AMARAL, B.P. *Efeitos da terapia anti-inflamatória não esteroide sobre a função renal durante o pós-cirúrgico de caninos submetidos à ovariectomia eletiva*. 2016. 27f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2016, 27 p.

BONFANTI, U.; ZINI, E.; MINETTI, E.; et al. Free lightchain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*, *J. Vet. Intern. Med.*, v. 18, n. 5, p. 618-624, 2004.

CASTRO, L.T.S.; DALL'AGNOL, M.; ARAUJO, M.S.; et al. Biomarcadores no diagnóstico precoce da injúria renal aguda, *Enc. Bios.*, v. 13 n.23; p. 216-241, 2016.

CHHABRA, S.; UPPAL, S.K.; SINGLA, L.D.; et al. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. *Asian Pac. Trop. Biomed.*, v. 3, n. 6, 483-486, 2013.

CODNER, C.E.; CACECI, T.; SAUNDERS, G.K.; et al. Investigação de lesões glomerulares em cães com aguda infecção induzida experimentalmente por *Ehrlichia canis*, *Vet. Am. J. Res.*, v. 53, n. 12, p. 2286-91, 1992.

CURTIS, J.R. Tetracycline and renal function. *Brit Med J*, v. 1, p. 52, 1972.

DE SCHEPPER, J.; DE COCK, I.; CAPIAU, E. Urinary gamma-glutamyltransferase and the degree of renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. *Res. Vet. Sci.*, v. 46, n. 3, p. 396-400, 1989.

FREITAS, G.C.; VEADO, J.C.C; CARREGARO, A.B. Testes de avaliação de injúria renal precoce em cães e gatos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 411- 426, 2014.

GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B.; et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic serologic and molecular findings, *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/1756-3305-3-33, 2010.

GENARO, O. *Leishmaniose visceral canina experimental*. 1993. 202f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 1993.

GONDIM, L.F.; KOHAYAGAWA, A.; ALENCAR, n. X.; et al. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Vet. Parasitol.*, v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.

HARRUS, S., KASS, p. H., KLEMENT, E., WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Vet. Rec.*, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

- HARVEY, T.V.; GUEDES, p. E.; OLIVEIRA, T.N.; et al. Canine hepatozoonosis in southeastern Bahia, Brazil, *Genet. Mol. Res.*, doi: 10.4238/gmr.15038623, 2016.
- HERRING, I.P.; PANCIERA, D.L.; WERRE, S.R. Longitudinal prevalence of hypertension, proteinuria, and retinopathy in dogs with spontaneous Diabetes Mellitus. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 28, n. 2, p. 488-95, 2014.
- IBBA, F.; MANGIAGALLI, G.; PALTRINIERI, S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *Vet. J.*, v. 210, p. 89–91, 2016.
- IRIS. International Renal Interest Society. IRIS Staging of CKD (modified 2015). Substaging by Proteinuria. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/about/projects_cpk.html>. Acesso em: 02 Set 2016.
- KANEKO J.J.; HARVEY J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
- KELLY, P.J.; XU, C.; LUCAS, H. et al. Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0053450, 2013
- KOVALINKA, A. Myo-Inositol Oxygenase: A Novel Kidney-Specific Biomarker of Acute Kidney Injury? *Clin. Che.*, v. 60, n. 5, p. 708-710, 2014.
- KULES, J.; DE TORRE-MINGUELA, C.; BARIĆ RAFAJ, R.; et al. Plasma biomarkers of SIRS and MODS associated with canine babesiosis. *Res. Vet. Sci.*, v. 105, p. 222-228, 2016.
- LOBETTI, R.; LAMBRECHTS, n. Effects of general anesthesia and surgery on renal function in healthy dogs, *Am. J. Vet. Res.*, v. 61, n. 2, p. 121-124, 2000.
- LOBETTI, R.G.; JACOBSON, L.S. Renal involvement in dogs with babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 72, n. 1, p. 23-28, 2001.
- LYNN, H.O.; RUDISILL Jr. E.; BRODKIN, R.; et al. Exacerbation of Renal Failure Associated With Doxycycline, *Arch. Intern. Med.*, v. 138, p. 793-794, 1978.
- MUNDIM, A.V.; MORAIS, I.A.; TAVARES, M.; et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 153, n. 1-2, p. 3-8, 2008.
- NALUBAMBA, K, S.MUDENDA, n. B, NAMWILA, M.M. et al. A study of naturally acquired canine babesiosis caused by single and mixed *Babesia* species in Zambia: clinicopathological findings and case management, *J. Parasitol. Res.*, doi: 10.1155/2015/985015, 2015.
- NEER, M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T. et al. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM* *J. Vet. Intern. Med.*, v. 16, p. 309-315, 2002.
- NIWETPATHOMWAT, A. A retrospective study of the therapeutic efficacy of doxycycline on concurrent canine ehrlichiosis and babesiosis in a veterinary hospital population. *Comp. Clin. Pathol.*, v. 15, p. 215-219, 2006.

- PALACIO, J.; LISTE, F.; GASCÓN, M. Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v. 3, n. 140, p. 477-480, 1997.
- RAFAJ, R.B.; KULES. J.; SELANEC, J. Markers of coagulations activation, endothelial Stimulation, and inflammation in Dog with Babesiosis. *J. Vet. Inter. Med.*, v. 22, n. 1, p. 1172-1178, 2013.
- RAMSEY, I.K.; GUNN-MOORE, D.; SHAW, S. Sistemas Hematopoiético e Linforreticular. In: Manual de doenças infecciosas em cães e gatos. Editora Roca, 1ed, p. 69-94, 2010.
- SIEW, E.D.; WARE, L.B.; IKIZLER, T. A. Biological Markers of Acute Kidney Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 22, p. 810–820, 2011.
- SILVA, M.L.; COSTA, C.A.; CINTRA, C.A.; et al. Alterações glomérulo-tubulares em caes infectados por *Ehrlichia canis*. *Invest*, v. 14, n. 6., p. 17-21, 2015.
- SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; RIBEIRO, M.F. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazamagouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerusdichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 177, n. 1-2, p. 61-66, 2011.
- SLADE, D.J.; LEES,G.E.; BERRIDGE, B.R.; et al. A resolução de uma nefropatia proteinúrica associada com infecção por *Babesia gbsoni* em um cão. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 47, n. 6, p. 138-44, 2011.
- SMETS, p. M.Y., MEYER, E., MADDENS, B.E. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. *J. Vet. Int. Med.*, v. 24, p. 65–72, 2010.
- STENBAEK, O.; MYHRE, E.; BERDAL, B. P. The effect of doxycycline on renal function in patients with advanced renal insufficiency. *Scand. J. Infect. Dis.*, v. 5, p. 199-202, 1973.
- SUDHAKARA, R.B.; SIVAJOTHI, S.; VARAPRASAD, R.L.S., et al. Clinical and laboratory findings of *Babesia* infection in dogs. *J. Parasit. Dis.*, v. 2, p. 268-272, 2016.
- TAMURA, K.; STECHER, D.; PETERSON, A.; et al. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Biol. Evol.*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- WOZNIAK, E.J.; BARR, B.C.; THOMFORD, J.W.; et al. Caracerização clínica, anatomica e imunopatologica de *Babesia gibsoni* o cão domestico (*Canis familiaris*). *J. Parasitol.*, v. 83, n. 4, p. 692-9, 1997.
- ZINI, E.; BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 65, n. 7, p. 964–971, 2004.

8. ARTIGO 5 - HORMÔNIOS TIREOIDIANOS DE CÃES COM *EHRlichia CANIS* MONO OU COINFECTADOS TRATADOS COM DOXICICLINA

Hormones thyroid with dogs with *Ehrlichia canis* mono or coinfectad treated with doxycycline

8.1. Resumo

A Síndrome do eutireoideo doente é descrita como a diminuição dos valores dos hormônios tireoidianos sem alteração primária da glândula tireoide. Esta síndrome pode afetar cães em consequência de diferentes afecções, inclusive nas infecções por hemoparasitos. A doxiciclina é considerada como fármaco de escolha na instituição do tratamento para *E. canis*, entretanto, seu uso na infecção de outros hemoparasitos ainda é controverso. Objetivou-se com este trabalho, verificar a presença da variação dos valores dos hormônios da glândula tireoide, em cães mono-infectados com *Erlichia canis* e coinfectados com *Babesia vogeli* e/ou *Anaplasma platys*, PCR positivos, antes e depois do tratamento com antibiótico. Pode-se afirmar que cães monoinfectados infectados com *E. canis* e coinfectados com *B. canis vogeli* e/ou *A. platys*, podem desenvolver a síndrome do eutireoideo doente. A doxiciclina na posologia utilizada foi efetiva em negatizar os cães com *E. canis*, após os 28 dias de tratamento, entretanto, não se mostrou efetiva em relação a infecção por *A. platys* e/ou *B. canis vogeli*, pois os cães continuaram ou se reinfectaram durante o período do tratamento.

Palavras-chave: Hemoparasitose, antibioticoterapia, diagnóstico molecular, glândula tireoide.

8.2. Abstract

“Euthyroid Sick Syndrome” is described as a reduction of thyroid hormones levels without primary thyroid gland alterations. This syndrome can affect dogs according to different disorders, including hemoparasite infections. Doxycycline is the drug of choice for treating *Erlichia canis* infection; however, its use in other hemoparasite infections is still controversial. The objective of this research was to verify thyroid hormones alterations in monoinfected dogs with *Erlichia canis* and coinfectad dogs with *Anaplasma platys* and/or *Babesia vogeli*, with positive PCR, after and before treatment with antibiotic and verify the efficacy of the treatment in dogs. It is possible to infer that dogs monoinfected with *E. canis* and coinfectad with *B. canis vogeli* and/or *A. platys*, can present “Euthyroid Sick Syndrome”. The posology of doxycycline used was effective to treat dogs with *E. canis*, after 28 days of treatment, however, it was not effective for treating *A. platys* and *B. canis vogeli* infections, once the dogs remained infected or were reinfectad during treatment period.

Keywords: Hemoparasites, antibiotic therapy, molecular diagnosis, thyroid gland.

8.3. Introdução

Ehrlichia canis (*E. canis*) é uma bactéria gram-negativa obrigatoriamente intracelular que coloniza linhagens monocíticas, pertencente à ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001). A erliquiose monocítica canina é uma doença provocada pelas bactérias do gênero *Ehrlichia*, com elevada prevalência e importância médico veterinária. No Brasil *E. canis* é o principal agente etiológico da doença (Vieira et al., 2011).

Anaplasma platys (*A. platys*) foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos no ano de 1978, como “rickettsia-like” (Harvey et al., 1978) e posteriormente foi denominada de *Ehrlichia*

platys (French e Harvey, 1983), e reclassificada como *Anaplasma platys* (Dumler et al., 2001). Estes microrganismos formam inclusões intraplaquetárias e são os agentes etiológicos responsáveis por promover a trombocitopenia cíclica nos cães (Arraga-Alvorado et al., 2003).

Protozoários do gênero *Babesia* foram os primeiros agentes infecciosos descritos como patógenos transmitidos por artrópode, que podem acarretar enfermidades a animais vertebrados (Vannier et al., 2008). No Brasil a *Babesia canis vogeli* é tida como o principal agente causador da babesiose canina (Passos et al., 2005). A enfermidade pode ser extremamente grave, acomete diferentes órgãos e tecidos como o fígado, rins, pulmões, pâncreas e músculos (Kules et al., 2016).

A coinfeção por hemoparasitos é frequentemente observada em cães (Foglia-Manzino et al., 2006), pois, um mesmo vetor é capaz de transmitir uma ampla variedade de patógenos (Diaz, 2016).

Na fisiologia da tireoide, a glândula é ativada pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH) e produz os hormônios, tiroxina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3). Os hormônios T4 e T3 têm efeitos sobre o metabolismo celular e sua deficiência desencadeia sinais clínicos vagos, inespecíficos e não patognomônicos (Finora e Greco, 2007). Os hormônios da tiroide (T4, T3) e triiodotironina reverso (rT3) são transportados por diferentes proteínas, exceto na hipófise, onde compartilham o mesmo transportador. Os mecanismos de transportes são dependentes da carga elétrica da célula e do gradiente de sódio na membrana citoplasmática. Nas doenças extras tireoidianas e na inapetência, a transformação de T4 em T3, nas células, encontra-se diminuído, resultando numa baixa concentração plasmática de T3, considerada como um mecanismo de economia de energia em situações de estresse (Henneman & Krenning, 2007).

A síndrome observada em cães que se apresentam com valores dos hormônios tireoidianos diminuídos, apesar da glândula tireoide manter-se funcional é denominada síndrome do eutireoideo doente (Mooney et al., 2008), esta síndrome foi descrita em cães com *B. canis* (Zygner et al., 2015), *B. rossi* (Schoeman et al., 2007) e *E. canis*, mono ou coinfectados com *B. gibsoni* (Kumar et al., 2006).

Embora existam poucas descrições da síndrome do eutireoideo doente (SED), em animais com erliquiose canina (Kumar et al., 2006), não há relatos da coinfeção da *E. canis* com *A. platys* e/ou *B. canis vogeli* levando a SED.

Objetivou-se com este trabalho verificar a presença das alterações hormonais tireoidianas em cães infectados com *Ehrlichia canis* e coinfectados com *Anaplasma platys* e /ou *Babesia canis vogeli*, antes e depois do tratamento com cloridrato de doxiciclina.

8.4. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal, da Universidade Federal do Espírito Santo - ES, sob o número 047/2015.

8.4.1. Cães

Foram incluídos no presente estudo, 12 cães maiores de um ano de idade, independentes de raça e sexo, manifestando pelo menos três critérios clínicos e ou laboratoriais compatíveis com erliquiose canina (Neer et al., 2002) e todos positivos para *E. canis* por meio de nested PCR (nPCR). Os cães possuíam média de idade de 3,8 anos de idade e não apresentavam sinais clíni-

cos compatíveis com hipotireoidismo. Os animais foram divididos em dois grupos, onde G1 corresponde aos animais com monoinfecção e G2 aos animais coinfectados com *A. platys* e/ou *B. vogeli*. Todos os cães foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES.

8.4.2. Hormônios tireoidianos

A avaliação das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos triiodotironina (TT3), tetraiodotironina (TT4), tetraiodotironina livre (T4L) e hormônio estimulante da tireoide canina (TSHc) foram mensurados antes (D1) e 28 dias após o início do tratamento com doxiciclina (D2). A concentração total de TT3, TT4 e T4L foi mensurado por quimioluminescência, um ensaio competitivo (Immulate 2000 human, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL), a concentração sérica TSHc foi mensurado pela técnica de quimioluminescência (Immulate 2000 Canine TSHc, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). As amostras de soro foram inicialmente armazenadas a -20°C em tubos plásticos, e transportadas em gelo seco, para o Laboratório Hermes Pardini, divisão veterinária, Belo Horizonte, MG, onde foram armazenadas a -80°C até a análise. Valores de TT3, TT4, T4L e TSHc, foram comparados com intervalos de referência do laboratório (TT3: 0.45-1.10 ng/mL; TT4: 1.2-4.0µ/dL; T4L: 0.50-1.60ng/dL; TSHc: 0.04-0.40ng/mL). Todos os ensaios foram validados para utilização no cão. Os padrões, amostras e controles foram realizados em duplicata.

8.4.3. Análises moleculares

O DNA foi extraído a partir de 300µL de sangue de cada cão, com o Kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. A PCR foi realizada pelas técnicas convencional e nestedPCR (nPCR). Utilizou-se uma alíquota do primeiro produto de PCR amplificado para a segunda reação de nPCR. Os iniciadores foram utilizados para detectar: *Babesia spp*, membros da família Anaplasmataceae que infectam monócitos, granulócitos e plaquetas, descrito por Silveira et al. (2011).

Os produtos da amplificação da PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1% (40 min, 100 V), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta. As amostras positivas foram purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Biotecnologia Brasil, São Paulo, Brasil) conforme o fabricante. E sequenciadas com o Applied Biosystems modelo ABI3130 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o Applied Biosystems BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (v.3.1), com o polímero POP-7™ como matriz de separação e os primers utilizados na reação de PCR. As sequências foram alinhadas, editadas e analisadas utilizando MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). A identidade de cada sequência foi confirmada por comparação com as sequências disponíveis no GenBank com auxílio do software BLAST (Altschum et al., 1990).

8.4.4. Tratamento

Todos os animais do G1 e do G2 receberam cloridrato de doxiciclina, na dose de 10 mg/kg SID, por 28 dias, como droga única, por ser considerado o protocolo padrão determinado pelo Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) para o tratamento da erliquiose canina (Neer et al., 2002). Estes animais foram avaliados no tempo D1 (antes do tratamento) e no tempo D2 (depois de 28 dias de tratamento).

8.5. Resultados

Os resultados foram apresentados por meio do método de análise de porcentagem. Observou-se no presente estudo que 12/12 (100%) dos cães estavam infectados com *E. canis* antes do início do tratamento com doxiciclina (Tabela 6) e 6/12 apresentaram-se coinfectados, onde, 3/6 mostraram coinfeção por *B. canis vogeli*; 2/5 por *A. platys* e 1/5 por *A. platys* e *B. canis vogeli*.

Tabela 6: Valores individuais dos hormônios tireoidianos antes e após tratamento com doxiciclina de cães PCR positivos para hemoparasitoses.

		Hormônios tireoidianos								
Animais	Hemoparasito	TSH (ng/ mL)	T3 (ng/ mL)	T4L (ng/ mL)	T4 To- tal (µ/dL)	Hemoparasito	TSH (ng/ mL)	T3 (ng/ mL)	T4 – Li- vre (ng/mL)	T4 – To- tal (ng/mL)
Grupo 1 - monoinfectados										
Antes do tratamento						Após o tratamento				
1	<i>E. canis</i>	0.35	2.94	0.53	0.79	Negativou	0.25	2.42	0.69	1.72
2	<i>E. canis</i>	0.4	0.34	0.59	0.66	Negativou	0.08	0.59	0.99	1.82
3	<i>E. canis</i>	0.09	1.44	1.03	2.31	Negativou	0.05	0.74	0.86	1.44
4	<i>E. canis</i>	0.2	0.35	0,69	1.04	<i>B. vogeli</i> ; <i>A. platys</i>	0.09	0.57	0.65	0.99
5	<i>E. canis</i>	0.4	0.4	0.5	0.5	<i>A. platys</i>	0.25	0.53	0.61	0.71
6	<i>E. canis</i>	0.09	0.15	0.65	0.63	<i>A. platys</i>	0.05	0.55	0.62	1.00
Grupo 2 - coinfectados										
Antes do tratamento						Após o tratamento				
7	<i>E. canis</i> ; <i>B.vogeli</i> ; <i>A. platys</i>	0.22	1.22	0.63	1.09	Negativou	0.22	0.93	0.87	1.20
8	<i>E. canis</i> ; <i>B. vogeli</i>	0.09	0.68	0.87	0.81	<i>B. vogeli</i> ; <i>A. platys</i>	0.05	0.74	1.01	2.21
9	<i>E. canis</i> ; <i>B.vogeli</i>	0.22	2.28	0.74	1.54	<i>B. vogeli</i>	0.04	0.62	1.03	2.92
10	<i>E. canis</i> ; <i>B. vogeli</i>	0.40	0.27	0.61	0.32	<i>B. vogeli</i>	0.08	0.67	1.12	0.98
11	<i>E. canis</i> ; <i>A. platys</i>	0.06	1.21	1.11	2.98	<i>B. vogeli</i> ; <i>A. platys</i>	0.08	0.54	1.03	1.96
12	<i>E.canis</i> ; <i>A. platys</i>	0.22	0.52	0.68	0.81	<i>A. platys</i>	0.05	0.63	0.82	1.38
Valores de refe- rência*		0.04- 0.40	0.45- 1.10	0.50- 1.60	1.2-4.0	Valores de refe- rência	0.04- 0.40	0.45- 1.10	0.50-1.60	1.2-4.0

*Fonte: Laboratório de análises Clínicas Hermes Pardini – Divisão Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Após o tratamento, todos os cães tornaram-se negativos, pela nested PCR, para *E. canis*. Desses 12 cães, oito permaneceram com infecção ou se reinfetaram durante os 28 dias de tratamento, por outros hemoparasitos, quando foram detectados 3/12 *A. platys*, 2/12 com *B. canis vogeli* e 3/12 com *A. platys* e *B. canis vogeli*. Dos animais do grupo G1, no tempo D2, 50% negativaram para *E. canis* e não se reinfetaram e 50% se reinfetaram com outros hemoparasitos, desses 2/3

(66,67%) se reinfectaram com *A. platys* e 1/3 (33,34%) com *A. platys* e *B. canis vogeli*. No G2 no Tempo D2, 1/6 (16,67%) negativou para todos os patógenos e 5/6 (53,34%) mantiveram-se infectados ou se reinfectaram com outros hemoparasitos.

Quanto aos hormônios tireoidianos no tempo D1, 4/6 dos cães do grupo G1 apresentaram valores reduzidos para o hormônio T3; e 5/6 para o T4T. No tempo D2 todos os cães que se negataram para *E. canis*, apresentaram os hormônios T3 e T4T dentro dos valores de normalidade. Dos cães do grupo G1, 3/6 se reinfectaram com outros hemoparasitos e mantiveram os valores de T4T reduzidos (Tabela 6).

No D1, o grupo G2, 6/6 (100%) apresentaram-se com *E. canis*. Um cão, 1/6 foi positivo para *E. canis*; *B. vogeli* e *A. platys* e apresentou valores do hormônio T3 elevado com T4T reduzido; um cão 1/6 com *E. canis* e *B. vogeli* e valores de T4T diminuído; 1/6 com *E. canis* e *B. vogeli* e valores de T3 diminuído; 1/6 cão com *E. canis*; *B. vogeli* com T3 e T4T diminuído, 1/6 com *E. canis* e *A. platys* apresentou T3 elevado e 1/6 com *E. canis* e *A. platys* com T4T diminuído.

O grupo G2, no D2, o cão com três hemoparasitos negativou para todos os patógenos, e os cães do G2 que se mantiveram infectados ou se reinfectaram para *A. platys* e/ou *B. canis vogeli*, apresentaram os valores hormonais com retorno a normalidade. Entretanto, um cão com *B. canis vogeli* manteve os valores de T4T reduzido.

8.6. Discussão

O medicamento cloridrato de doxiciclina, na dose utilizada e recomendada, foi efetivo para negatizar a infecção por *E. canis* no D2. Esta é a droga de escolha na rotina clínica médica e atuou da forma esperada sobre esta rickettsia. No que se refere à erliquiose canina nossos resultados foram semelhantes aos descritos por Gaunt et al. (2010), entretanto, divergem do mesmo autor em relação à infecção por *A. platys*, pois neste estudo, o fármaco não foi eficaz em negatizar os cães infectados. Os resultados assemelham-se aos de Buzouraa et al. (2016) que descrevem a doxiciclina como não eficaz no tratamento de cães infectados por *A. platys*.

Somente um cão, o número 1 do grupo G2 (Tabela 6) se negatizou por completo dos diferentes hemoparasitos, este fato pode ter ocorrido pela ação do antibiótico, ou a droga pode ter influenciado na migração dos parasitos da circulação periférica para os órgãos linfóides do hospedeiro, os quais não foram avaliados no presente estudo, ou como relataram Harrus et al. (1998) pela capacidade do animal apresentar autocura, pois evidenciaram a recuperação de cães infectados com *E. canis*, sem tratamento médico. Esta pode ser uma realidade também para cães infectados com *A. platys* e *B. canis vogeli*, entretanto é necessário mais estudos.

Os resultados deste trabalho mostraram que a doxiciclina não foi efetiva na eliminação da babesiose canina e coincidem com a descrição de Vercammen et al. (1996), onde o antibiótico não foi efetivo no controle deste hemoparasito e divergem dos resultados de Niwetpathomwant et al. (2006) que o fármaco foi efetivo em negatizar os cães com babesiose mono ou coinfectados com *E. canis*.

Todos os cães do presente estudo permaneceram vivos, durante o período de acompanhamento, apresentaram melhora clínica, independente de se manterem infectados com outros hemoparasitos, possivelmente porque a doxiciclina é considerada um quimioterápico com atividade imunestimulante, descrito por Tosta (1983) e/ou pelo aumento de linfócitos B CD21+, como descrito

em cães com ou sem erliquiose, tratados com doxiciclina, reportado por Villaescusa et al. (2015).

A redução dos valores de T3 e T4T retrata a síndrome do eutireoideo doente (SED), síndrome do triiodotironina (T3) baixo, também denominada síndrome da doença não tireoidiana, nos animais do presente estudo. Além dos cães não demonstrarem nenhum sinal clínico compatível com hipotireoidismo durante a realização do estudo.

Quanto ao T3, 5/12 cães deste estudo apresentaram valores reduzidos, e concorda com Zygnier et al. (2015) que demonstraram, em cães infectados com *B. canis*, a síndrome de baixo T3, reportaram também que a gravidade da doença é considerada fator importante na redução das concentrações de hormônios da tiroide. E, de acordo com Elliot et al. (1995) a SED pode ocorrer em cães com doença grave não tireoidiana, além disso, a extensão da redução das concentrações séricas de T3, podem estar correlacionadas com a mortalidade.

A SED no presente estudo é a primeira descrição, em cães com *E. canis* coinfectados com *A. platys* e/ou *B. canis vogeli*, mas já foi reconhecida em diferentes hemoparasitoses, conforme Shoeman et al. (2007) na babesiose canina causada pela *B. rossi*, onde se manifestou pela diminuição do TSH sérico, tiroxina total (TT4) e das concentrações de tiroxina livre (T4L).

Neste estudo, os animais que se mantiveram infectados após o tratamento, também permaneceram com os valores dos hormônios tireoidianos abaixo da referência e concorda com a descrição de Mooney et al. (2008) quando relataram que a síndrome pode ser mais comum em cães do que reconhecido anteriormente. Em humanos, Wajner, Maia (2012) descreveram que a SED apresenta níveis hormonais da tiroide reduzidos em doentes críticos, na ausência de disfunção primária hipotálamo-hipófise-tiroide, onde indivíduos afetados apresentam valores reduzidos de T3 e TSH normais, assim como esses cães. E, corroboram com Mooney et al. (2008), pois as concentrações de hormônios da tiroide podem ser utilizadas como indicadores prognósticos, em cães com doença não tireoidiana que desenvolveram a SED.

Durante a realização da obtenção do sangue, para os exames laboratoriais, notou-se a presença de carrapatos em todos os cães participantes deste trabalho, o que pôde contribuir para a presença das coinfeções observadas, onde 50% dos cães apresentaram-se com dois ou mais hemoparasitos associados, o que corrobora com as informações de De Tommasi et al. (2013) que as coinfeções complicam o diagnóstico e o tratamento, e podem ainda influenciar negativamente no prognóstico.

Antes do tratamento, no momento da admissão 7/12 (58,3%) dos cães positivos para *E. canis* mono ou coinfectados, apresentaram diminuição das concentrações basais para os valores do hormônio T3 e/ou T4T, estes resultados corroboram com os achados de Kumar et al. (2007), onde descreveram que os cães infectados com *E. canis* mono ou coinfectados apresentaram diminuição dos valores dos hormônios tireoideanos, assim como Zygnier et al. (2015) que observaram valores da concentração TT3 sérico abaixo do intervalo de referência em quatro dos 13 cães infectados com *B. canis* e também com os achados de Schoeman et al. (2007) onde (71%) dos cães com *B. rossi* apresentaram as concentrações basais de tiroxina, no momento da admissão, abaixo do intervalo de referência estabelecido.

Dos cães monoinfectados e coinfectados com *E. canis*, após tratamento, 10/12 normalizaram os valores hormonais de T3, o que leva a concordar com Cardoso et al. (2016) que reportaram as alterações nas concentrações dos hormônios tireoidianos, decorrentes de doenças não tireoidia-

nas e consideraram a síndrome do eutireoideo doente, e ainda com Kumar et al. (2006) que demonstraram a diminuição dos hormônios da tireoide, nestes cães enfermos, e ressaltaram que este fato pode representar uma adaptação por parte do corpo do animal com a finalidade de reduzir o metabolismo celular durante o período da doença.

Os valores basais de T4L, nos animais coinfectados com *B. canis vogeli* apresentaram-se normais no D1 e D2 e diferem dos resultados observados por Schoeman et al., (2007) em cães infectados por *B. rossi*, onde descreveram que (54%) dos cães, apresentaram as concentrações T4L basal abaixo da faixa normal em comparação com os cães saudáveis, entretanto, deve-se levar em consideração a patogenicidade do parasito, quando se referem a infecção por *B. rossi* em cães.

Ao analisar a Tab.1 nota-se que os cães que negativaram, para todos os hemoparasitos após tratamento, retornaram aos valores hormonais normais, enquanto que os cães que permaneceram com coinfeção, (5/12) 41,7% ainda mantiveram os valores de T4T reduzidos, e se assemelham aos resultados De Tommasi et al. (2013) que descreveram cães coparasitados permaneceram com valores de T4T reduzido, mesmo após ao tratamento.

O presente estudo concorda com as explicações de Kumar et al. (2006) onde a diminuição dos níveis de T3 e T4 na erliquiose, com ou sem babesiose, poderia ter mediado a diminuição da taxa metabólica, e deprimido os tecidos linfóides primários e secundários em resposta ao estresse provocado por *E. canis*, com ou sem infecção da *B. gibsoni*, o que pode prejudicar o hospedeiro por perturbar a regulação do sistema endócrino.

8.7. Conclusões

Cães que apresentaram infecção por *E. canis*, monoinfectados ou coinfectados com *B. canis vogeli* e/ou *A. platys*, podem desenvolver a síndrome do eutireoideo doente.

8.8. Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. and LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool, *Journal of molecular biology.*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O. and SALAS, P. Ehrlichia platys (Anaplasma platys) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections, *Veterinary Pathology. Online.*, v. 40, p. 149-156, 2003.
- BOUZOURAA, T.; RENÉ-MARTELLET, M.; CHÊNE, J.; ATTIPA, C.; LEBERT, I.; CHALVET-MONFRAY, K.; CADORÉ, J.L.; HALOS, L. AND CHABANNE, L. Clinical and laboratory features of canine Anaplasma platys infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin, *Ticks and Tick-borne Diseases.*, v. 7, p. 1256-1264, 2016.
- DE TOMMASI, A. S.; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPELLI, G.; BREITSCHWERDT, E. B. and DE CAPRARIIS, D. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs?, *Parasites & vectors.* v. 6, p. 1, 2013.
- DIAZ, M. J. Tickborne Coinfections in the United States., *The Journal of the Louisiana State Medical Society: official organ of the Louisiana State Medical Society.*, v. 168, p. 44, 2016.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y. and 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.

ELLIOTT, D. A.; KING, L. G. AND ZERBE, C. A. Thyroid Hormone Concentrations In Critically III Canine Intensive Care Patients, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.*, v. 5, p. 17-23, 1995.

FINORA, K. AND GRECO, D. Hypothyroidism and myxedema coma, *Compendium*, 2007.

FOGLIA, M. V.; CAPPIELLO, S. and OLIVA, G. Tick-transmitted diseases in dogs: clinicopathological findings., *Parasitologia.*, v. 48, p. 135-136, 2006.

FRENCH, T. W. and HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test., *American journal of veterinary research.*, v. 44, p. 2407-2411, 1983.

GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. ; CHANDRASHEKAR, R. and BREITSCHWERDT, E. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings, *Parasites & vectors.*, v. 3, p. 1, 2010.

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

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F. and GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs, *Journal of Infectious Diseases.*, v. 137, p. 182-188, 1978.

HENNEMANN, G. and KRENNING, E. P. The kinetics of thyroid hormone transporters and their role in non-thyroidal illness and starvation, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.*, v. 21, p. 323-338, 2007.

KULEŠ, J.; DE TORRE-MINGUELA, C.; RAFAJ, R. B.; GOTIĆ, J.; NIŽIĆ, P. ; CERON, J. AND MRLJAK, V. Plasma biomarkers of SIRS and MODS associated with canine babesiosis, *Research in veterinary science.*, v. 105, p. 222-228, 2016.

KUMAR, A.; VARSHNEY, J. and VARSHNEY, V. Endocrine dysfunction in chronic severe ehrlichiosis with or without babesiosis in dogs, *Veterinary research communications.*, v. 30, p. 911-916, 2006.

MOONEY, C.; SHIEL, R. and DIXON, R. Thyroid hormone abnormalities and outcome in dogs with non-thyroidal illness, *Journal of Small Animal Practice.*, v. 49, p. 11-16, 2008.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T. and 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.*, v. 16, p. 309-315, 2002.

NIWETPATHOMWAT, A. A retrospective study of the therapeutic efficacy of doxycycline on concurrent canine ehrlichiosis and babesiosis in a veterinary hospital population, *Comparative Clinical Pathology.*, v. 15, p. 215-219, 2006.

- PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K. and ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil, *Veterinary Parasitology.*, v. 127, p. 81-85, 2005.
- SCHOEMAN, J. P.; REES, p. and HERRTAGE, M. E. Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by *Babesia canis rossi*, *Veterinary parasitology.*, v. 148, p. 75-82, 2007.
- DA SILVEIRA, J. A.; RABELO, É. M. and RIBEIRO, M. F. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil, *Veterinary parasitology.*, v. 177, p. 61-66, 2011.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. and KUMAR, S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular biology and evolution.*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TOSTA, C. E. Modificação da resposta imune por agentes quimioterápicos, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, v. 16, p. 3-5, 1983.
- VANNIER, E.; GEWURZ, B. E. and KRAUSE, P. J. Human babesiosis, *Infectious disease clinics of North America.*, v. 22, p. 469-488, 2008.
- VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R. and MAES, L. Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline, *Veterinary parasitology.*, v. 66, p. 251-255, 1996.
- VIEIRA, R. F. D. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P. D.; SANTOS, R. P. D.; DUTRA, L. H.; DINIZ, p. P. V. D. P.; MORAIS, H. A. D.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B. and others. Ehrlichiosis in brazil, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.*, v. 20, p. 01-12, 2011.
- VILLAESCUSA, A.; GARCIA-SANCHO, M.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; TESOURO, M. Á. and SAINZ, Á. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *The Veterinary Journal.*, v. 204, p. 263-268, 2015.
- WAJNER, S. M. and MAIA, A. L. New insights toward the acute non-thyroidal illness syndrome, *Frontiers in endocrinology.*, v. 3, p. 8, 2012.
- ZYGNER, W.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; BAŞKA, P. and DŁUGOSZ, E. Low T3 syndrome in canine babesiosis associated with increased serum IL-6 concentration and azotaemia, *Veterinary parasitology.*, v. 211, p. 23-27, 2015.

9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. B.; LINHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citocinas. In: ABBAS, A. B.; *Imunologia celular e molecular*, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 267-301.
- ABDALLA, H. S.; HUSSEIN, H. S.; KREIER, J. P. *Babesia rodhaini*: passive protection of mice with imune serum. *Tropen. Med. Parasitol.*, v. 29, n. 3, p. 295-306, 1978.
- ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.; DE MACEDO, A. A.; et al. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomídeos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, n. 1, p. 197-203, 2008.
- ADACHI, K.; TATEISHI, M.; HORII, Y.; et al. Immunologic characteristics of anti- erythrocyte membrane antibody. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 57, n. 1, p. 121-123, 1995.
- ADACHI, K.; TATEISHI, M.; HORII, Y.; et al. Reactivity of serum anti-er erythrocyte membrane antibody in *Babesia gibsoni*-infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 56, n. 5, p. 997-999, 1994.
- ADAMS, R.; MCCLURE, J. J.; GOSSETT, K. A.; et al. Evaluation of a technique for measurement of gamma-glutamyltranspeptidase in equine urine, *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, n. 1, p. 147-150, 1985.
- ADASZECK, L.; JAROSZ, L.; KALINOWSKI, M.; et al. Changes in selected subpopulations of lymphocytes in dogs infected with *Babesia canis* treated with imidocarb. *Tierarztl Prax Ausg K kleintiere heimtiere*, v. 2, p. 94-100, 2015.
- ADASZEK, L.; BANACH, T.; BARTNICKI, M.; et al. Application the mass spectrometry MALDI-TOF technique for detection of *Babesia canis canis* infection in dogs. *Parasitol. Res.*, v. 11, p. 4293-4295, 2014.
- AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; BRAGA, I. A.; et al. Detection of genotype-specific *Ehrlichia canis* exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 1, p. 142-145, 2016.
- AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Saúd. Prod. Anim.*, v. 8, n. 4, p. 283-294, 2007.
- AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; et al. Comparison between different polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Ann. of NY Acad. Science*, v. 1149, n. 1, p. 118-120, 2008.
- AKTAS, K.; ÖZÜBEK, S.; ALTAY, K.; et al. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-015-0763-z, 2015.
- ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. *Publ. Med.*, n. 196, p. 71-87, 1956.
- ALEXANDRE-PIRES, G. M.; CORREIA, J. J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I. P. *Leishmaniose canina*. Lisboa, Ed. Chaves Ferreira, 2008. p.53-67.

- ALMEIDA M, A.; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L.; et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.
- ALTET, T.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 6, p. 2763-2771, 2002.
- ALVES, A.S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F.B.; et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res. Vet. Sci.*, v. 93, n. 3, p. 1329-1333, 2012.
- ALVES, G.B.; SILVA, L.S.; BATISTA, J.F.; et al. The sero-conversion and evaluation of renal alterations in dog infected by *Leishmania (infantum) chagasi*. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, v. 55, n. 2, p. 105-112, 2013.
- AMARAL, B.P. *Efeitos da terapia anti-inflamatória não esteroideal sobre a função renal durante o pós-cirúrgico de caninos submetidos à ovariectomia eletiva*. 2016. 27f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2016, 27 p.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Europ. J. Epidem.*, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.
- ANDRADE, H.M.; TOLEDO, v. P.; PINHEIRO, M.B.; et al. Evaluation of miteltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 181, n. 2-4, p. 83-90, 2011.
- ANTOIGNONI, M.T.; VERONESI, F.; MORGANTI, G.; et al. Natural infection of *Anaplasma platys* in dogs from Umbria region (Central Italy), *Vet. Ital.*, v. 1, p. 49-56, 2014.
- ARAÚJO, W. L. *Avaliação da atividade e da estabilidade de GGT urinário de cães hígidos*. Dissertação apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais. 2014. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.
- ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; et al. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. *Vet. Pathol.*, v. 40, p. 149-156, 2003.
- ARRAGA-ALVORADO, C.M.; QUROLLO, B.; PARRA, O.C.; et al. Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, pii: 14-0372, 2014.
- ASGARALI, Z.; PARGASSI, I.; ADAM, J.; et al. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. *Ticks tick-borne dis.*, v. 3, n. 4, p. 207-211, 2012.
- AZEDEDO, S.S.; AGUIAR, D.M.; AQUINO, S.F.; et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Erlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. *Bra. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.

- BABA, K.; ITAMOTO, K.; AMIMOTO, A.; et al. *Ehrlichia canis* infection in two dogs that emigrated from endemic areas. *J. Vet. Med. Sci.* v.74, n. 6, p. 775-778, 2012.
- BABES, v. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf, *C. R. Acad. Sci.* v.107, p. 692-694, 1888.
- BAKER, J.L.; CRAIG, T.M.; BARTON, C.L.; et al. *Hepatozoon canis* in dog with oral pyogranulomas and neurologic diseases, *Cornell Vet.*, v. 78, n. 2, p. 179-183, 1988.
- BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet. Parasitol.*, v. 181, n. 1, p. 3-11, 2011.
- BANETH, G.; BARTA, J.R.; SHKAP, v. ; et al. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level, *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 3, p. 1298-1301, 2000.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; GAL, A. et al. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes, *Vet. Parasitol.*, v. 208, n. 1-2, p. 30-34, 2015.
- BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, v. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*), *J. Parasitol.*, v. 93, n. 2, p. 283-299, 2007.
- BANETH, G.; SHKAP, v. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*, *J. Parasitol.*, v. 89, n. 2, p. 379-381, 2003.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Canine Leishmaniasis. In: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.735-748, 2012.
- BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 11, n. 6, p. 365-370, 1997.
- BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M.L.; NUNES, A.Z. et al. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immun.*, v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.
- BENTLEY, C.A. Preliminary note upon a leucocytozoan of the dog. *Br. Med. J.*, 10.1136/bmj.1.2314.988, 1905.
- BHADESIYA, C.M.; RAVAL, S.K. Hematolobiochemical changes in ehrlichiosis in dogs of Anand region, Gujarat, *Vet. World*, v. 6, p. 713-717, 2015.
- BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, p. ; et al. Atypical forms of canine leishmaniasis. *Vet. J.*, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.
- BOBADE, p. A.; ODUYE, O.O.; AGHOMO, H.O. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in the endemic area. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.*, v. 42, n. 2, p. 211-217, 1989.
- BOUZA-MORA, L.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; et al. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica, *Ticks Tick Borne Dis.*, doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.012, 2016.
- BOUZOURAA, T.; RENÉ-MARTELLET, M.; CHÊNE, J.; et al. Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. *Ticks Tick Borne Dis.*, doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.07.004, 2016.

- BRANDÃO, L.P.; HAGIWARA, M. K.; MYIASHIRO, S.I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Vet. Parasitol.*, v. 114, n. 4-5, p. 253-265, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Aspectos epidemiológicos*. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_obitos_05_09_11.pdf>. Acesso em: 25 de agosto. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade*. – Brasília. Disponível em: <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_viscerale_reducao_letalidade.pdf>. Acesso em 20 de Agosto de 2016.
- BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; QUOROLLO, B.A.; et al. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit. Vectors.*, doi: 10.1186/1756-3305-7-298, 2014.
- BRENNER, K.; HARKIN, K.; SCHERMERHORN, T. Iatrogenic, sulfonamide-induced hypothyroid crisis in a Labrador Retriever, *Ust Vet. J.*, v. 87, n. 12, p. 503-505, 2009.
- BRIANTI, E.; NAPOLI, E.; GAGLIO, G.; et al. Field evaluation of two diferente treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniasis in a highly endemic área, *Plos. Negl. Trop. Dis.*, doi: 10.1371/journal.pntd.0004987. eCollection, 2016.
- BROBST, D.F.; CARROLL, R.J.; BAYLY, W.M. Urinary enzyme concentrations in healthy horses, *Cornell Vet*, v. 76, n. 3, p. 299-305, 1986.
- BROWN, G. K.; MARTIN, A.R.; ROBERTS, T. K.; et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 83, p. 101-102, 2005.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K., ARAÚJO, p. J.J., TRINCA, L.A., LOPES, R.S., WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area, *Vet. Res.*, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.
- BURGHEN, G. A.; BEISEL, W. R.; WALKER, J. S.; et al. Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *Am. J. Vet. Res.*, v. 32, n. 5, p. 749-759, 1971.
- CAKAN, H.; SUAT, S.; VECDETO, O.; et al. Patients with suspected visceral leishmaniasis in Istanbul. *Afr. J. Microb. Reser.*, v. 4, n. 2, p. 103-109, 2010.
- CAMACHO, A.T.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; *Babesia canis* infection in a splenectomized dog, *Bull Soc. Pathol. Exot.*, v. 95, n. 1, p. 17-19, 2002.
- CAMARGO-NEVES, v. L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGES, L.C.; SPINOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999, *Cad. Saúd. Publ.*, v. 17, n. 5, p. 1267-1267, 2001.
- CAO, S.; MOUSA, A.A.; ABOGE, G.O.; et al. Prime-boost vaccination with plasmid DNA followed by recombinant vacina vírus expressing BgGARP induced a partial protective immunity to inhibit *Babesia gibsoni* proliferation in dogs. *Acta Parasitol.*, v. 4, p. 619-623, 2013.

- CAPRARIIS, D.; DANTA-TORRES, F.; CAPELLI, G.; et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet. Microbiol.*, v. 1-2, 2016-212, 2011.
- CARCY, B.; PRÉCIGOUT, E.; SCHETTERS, T.; et al. Genetic basis for GPI- anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.*, v. 138, n. 1-2, p. 33-49, 2006.
- CARDINOT, C.B.; SILVA, J.E.; YAMATOOGI, R.S et al. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Parasitol.*, v. 2, p. 275-279, 2016.
- CARDINOT, C.B.; SILVA, J.E.; YAMATOOGI, R.S.; et al. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Parasitol.*, v. 2, 275-279.
- CARDOSO, L.; OLIVEIRA, A.C.; GRANADA, S.; et al. Molecular investigation of tick-borne pathogens in dogs from Luanda, Angola. *Parasite Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1536-z, 2016.
- CARLOS, R.S.A.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; et al. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.20, n. 3, p. 210-214, 2011.
- CASTONGUAV, R.; LHERBET, C.; KEILLOR, J.W.; Kinetic studies of rat kidney gamma-glutamyltranspeptidase deacylation reveal a general base-catalyzed mechanism, *Biochemistry*, v. 42, n. 39, p. 11504-11513, 2003.
- CASTRO, A.G.; SILVA, A.R.; COSTA, C.H.N.; SCHERLOCK, I. *Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): normas técnicas*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86 p.
- CASTRO, I.P.; SOUSA, M.V.C.; MAGALHÃES, M.; et al. Perfil hepático e proteico em cães com leishmaniose visceral. *Biosc. J.*, v. 28, n. 5, p. 799-804, 2012.
- CASTRO, L.T.S.; DALL'AGNOL, M.; ARAUJO, M.S.; et al. Biomarcadores no diagnóstico precoce da injúria renal aguda, *Enc. Bios.*, v. 13 n.23; p. 216-241, 2016.
- CETINKAYA, H.; MATUR, E.; AKYAZI, I.; et al. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia spp.* and *Anaplasma spp.* in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 5, p. 706-714, 2016.
- CHANDRASHEKAR, R.; MAINVILLE, C.A.; BEALL, M.J.; et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 71, n. 12, p. 1443-1450, 2010.
- CHANG, W.L.; SU, W.L.; PAN, M.J. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 9, p. 849-851, 1997.
- CHAPMAN, W.E.; WARD, p. A. *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. *Science.*, v. 196, n. 4285, p. 67-70, 1977.

- CHHABRA, S.; UPPAL, S.K.; SINGLA, L.D.; et al. Retrospective study of clinical and hamatological aspectes associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. *Asian Pac. Trop. Biomed.*, v. 3, n. 6, 483-486, 2013.
- CHOCHLAKIS, D.; IOANNOU, I.; SHARIF, L.; et al. Prevalence of *Anaplasma sp.* in goats and sheep in Cyprus. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v. 5, p. 457-463, 2009.
- CIARAMELLA, p. ; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, *Vet. Record*, v. 141, n. 21, p. 53, p. 539-543, 1997.
- COBRIN, A.R.; BLOIS, S.L.; KRUTH, S.A.; et al. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat, *J. Sm. Anm. Pract.*, v. 54, n. 1, p. 647-655, 2013.
- CODNER, E.C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G.K.; et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 12, p. 2286-2291, 1992.
- CODNER, E.C.; FARRIS-SMITH., L.L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 189, n. 1, p. 47-50, 1986.
- COLOMBO, F.A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, v. L.; MEIRA, C. S., et al. Performance of real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a *L. (L.)infantum* hypothetical protein as target in canine samples. *Exp. Parasitol.*, v. 157, n1, p. 156-162, 2015.
- CORTESE, L.; SICA, M.; PIANTEDOSI, D.; et al. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Record*, v. 164, n. 25, p. 778-782, 2009.
- COSTA-JÚNIOR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L.M.; et al. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dog in rural and urban áreas of Minas Gerais State, Brazil. *Prev. Vet. Med.*, v. 3-4, p. 321-326, 2013.
- COSTA, J.O., SILVA, M., GUIMARÃES, M.P., BATISTA JUNIOR, J.A. *Erlichia canis* infecção em um cão, em Belo Horizonte-Brasil, *Arq. Esc. Vet. UFMG.* V, 25, p. 199-200, 1973.
- COSTA, L.M.; ZAHLER-RINDER, M.; RIBEIRO, M.F.; et al. Use of Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.*, doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.015, 2012.
- COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; COURA, F.M.; et al. Bioquímica sérica de cães infectados por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Leishmania sp.* *Act. Sci. Vet.*, v. 43, 1261, 2015.
- COURA-VITAL, W.; KER, H.G.; ROATT, B.M.; et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *Plos One*, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014.
- COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.
- COWGILL, L.D.; POLZIN, D.J.; ELLIOTT, J.; et al. Is progressive chronic kidney disease a slow acute kidney injury? *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v. 46, n. 6, p. 995-1013, 2016.

- D'ANDREA, L.A.; FONSECA, E.S.; PRESTES-CARNEIRO, L.E. et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, na a emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *BMC Vet. Res.*, doi: 10.1186/s12917-015-0583-6, 2015.
- DA COSTA, A.P.; COSTA, F.B.; LABRUNA, M.B.; et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia spp.* Among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 1, p. 28-35, 2015.
- DA COSTA, p. S.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem. do Inst. Osw. Cruz*, v. 100, n. 8, p. 853-859, 2005.
- DA SILVA, A.S.; MUNHOZ, T.D.; FARIA, J.L et al. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: effect on the pathogenesis of the disease. *Vet. Microbiol.*, v. 3-4, p. 366-369, 2013.
- DA SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.; et al. A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 5, p. 529-535, 2016.
- DA SILVA, D.A.; MADEIRA, M. F.; ABRANTES, T.R. et al. Assesment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. J.*, v. 195, n. 2, p. 252-253, 2013.
- DA SILVA, D.F., LIMA, M.C.J.S., SOTO-BLANCO, B. Perfil hematológico e eletroforético de proteínas séricas em cães soropositivos para leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Norte. *Acta Vet. Bras.*, v. 5, n. 3, p. 300-305, 2011.
- DA SILVA, G.C.; BENITZ, A, n. ; GIROTTTO, A. et al. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, p. 379-385, 2012.
- DA SILVA, S.M.; RIBEIRO, v. M.; RIBEIRO, R.R. et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 166, n. 1-2, p. 159-162, 2009.
- DABAGHMANESH, T.; ASGARI, Q.; MOEMENBELLAH-FARD, M.D.; et al. Natural transovarial and transtadial transmission of *Leishmania infantum* by naïve *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on na endemically infected dogs in Shiraz, South of Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 110, n. 7, p. 408-413, 2016.
- DAHMANI, M.; DAVOUST, B.; BENTERKI, M.S. et al. Development of a new PC based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 39, p. 39-45, 2015.
- DAMBACH, D.M.; SMITH, C.A., LEWIS, R.M.; et al. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesions in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet. Pathol.*, v. 34, n. 2, p. 85-96, 1997.

- DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L.A., BRANDÃO-FILHO, SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks on domestic animals in Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18, n. 3, p. 22-28, 2009.
- DAVOUS, B.; PARZY, D.; DEMONCHEAUX, J.P. U. t al. Usefulness of a rapid immunomigration test the detection of canine monocytic ehrlichiosis in Africa. *Comp. Immunol. Microbiol. Infected Dis.*, v. 1, p. 31-37, 2014.
- DE CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; DE AQUINO, et al. Experimental acute canine monocytia erlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.*, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.
- DE MIRANDA, R.L.; DE CASTRO, J.R.; OLEGÁRIO, M.M. et al. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Vet. Parasitol.*, v. 177, n. 3-4, p. 392-396, p. 392-396, 2011.
- DE SCHEPPER, J.; DE COCK, I.; CAPIAU, E. Urinary gamma-glutamyltransferase and the degree of renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. *Res. Vet. Sci.*, v. 46, n. 3, p. 396-400, 1989.
- DE SOUSA, K.C.; ANDRÉ, M.R.; HERRERA, H.M.; et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, p. 525-531, 2013.
- DE TOMASI, A.S.; GIANNELLI, A. DE CAPRARIIS, D.; et al. Failure of imidocarb dipropionate and totaltrazuril/emodepside plus clindamycin in treating *Hepatozoon canis* infection. *Vet. Parasitol.*, v. 200, n. 3-4, p. 242-245, 2014.
- DE TOMASI, A.S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; et al. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasit. Vectors*, v. doi: 10.1186/s13071-014-0534-2, 2014.
- DE TOMMASI, A.S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E.B. et al. *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v. 6, p. 2231-2234, 2014.
- DE TOMMASI, A.S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; et al. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-014-0534-2, 2014.(b)
- 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.*, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.
- DEMONER, L.C.; ANTUNES, J.M.A.P.; O'DWYER, L.H. Hepatozoonose canina no Brasil: Aspectos da biologia e transmissão, *Vet. e Zootec.*, v. 20, n. 2, p. 193-202, 2013.
- DEMONER, L.C.; MAGRO, n. M.; DA SILVA, M.R.; et al. *Hepatozoon spp.* infections in wild rodents in an área of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 7, n. 5, p. 859-864, 2016.

- DIM, L.F.; KOHAYAGAWA, A.; ALENCAR, n. X.; et al. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases, *Vet. Parasitol.*, v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.
- DJIBA, M.L.; MEDIANNIKOV, O.; MBENQUE, M.; et al. Survey of Anaplasmataceae bacteria in sheep from Senegal. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 45, p. 1557-1561, 2013.
- DO CARMO, G.M.; CRIVELLENTI, L.Z.; BOTTARI, n. B.; et al. Butyrylcholinesterase as a marker of inflammation and liver injury in the cute and subclinical phases of canine ehrlichiosis *Comp. Immunol. Microbiol. Infected Dis.*, v. 43, p. 16-21, 2015.
- DORVAL, M.E.; OSHIRO, E.T.; BRILHANTE, A.F.; et al. Sandflies in an urban area of transmission of visceral leishmaniasis in midwes Brazil, *Parasite*, doi: 10.1051/parasite/2016035, 2016.
- DOS SANTOS, J.P.; ALVES, L.C.; RAMOS, R.A.; et al. Histological changes and immunolabeling of *leishmania infantum* in kidney and urinary bladder of dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 22, n. 3, p. 420-423, 2013.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; et al. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.
- ECHAIDE, I. E.; HINES, S.A.; MCELWAIN, T.F.; et al. In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes, *Infect. Immun.*, v. 66, n. 6, p. 2922-2927, 1998.
- EDDLESTONE, S.M.; GAUNT, S.D.; NEER, T.M.; et al. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.*, v. 115, n. 2, p. 205-210, 2007.
- EDDLESTONE, S.M.; NEER, T.M.; GAUNT, S.; et al. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 20, n. 4, p. 840-844, 2006.
- EICHENBERGER, R.M.; RIOND, B.; WILI, B.; et al. Prognostic markers in acute *Babesia canis* infections. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 1, p. 174-182, 2016.
- ESHOO, M.W., CROWDER, C.D., LI, H., MATTHEWS, H.E., MENG, S., SEFERS, S.E., SAMPATH, R., STRATTON, C.W., BLYN, L.B., ECKER, D.J., TANG, Y.W. Detection and identification of *Ehrlichia* species in blood by use of PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Clin. Microb.*, v. 48, n. 2, p-472-478, 2010.
- FANTUCCI, I. *Contribuição do alerta, da atenção, da intenção e da expectativa temporal para o desempenho de humanos em tarefas de tempo de reação*. 2001. 130 f. Tese (Doutorado em Psicologia) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.
- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; BONELLO, F.L.; et al. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. *Vet. Not.*, v. 11, n. 2, p. 61-69, 2005.

- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clin. Vet.*, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine leishmaniasis in animals presenting diferente clinical manifestations, *Vet. Parasitol.*, v. 146, p. 235-241, 2007.
- FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; et al. Potencial role of dog fleas in the cycle of *Leishmania spp.* *Vet. Parasitol.*, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A M.; CASTRO, T.X.; et al. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 3, p. 301-308, 2014.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; et al. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular testes. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, v. 5, n. 1, p. 113-119, 2007.
- FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; et al. Dagnosis of *Hepatozoon spp.* in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 134, n. 1-2, p. 1-7, 2005.
- FORLANO, M.D.; TEIXEIRA, K.R.; SCOFIRLD, A. et al. Molecular characterization of *Hepatozoon sp.* from Brazilian dogs and its phylogenetic relation ship with other *Hepatozoon spp.* *Vet. Parasitol.*, v. 145, n. 1-2, p. 21-30, 2007.
- FOURIE, J.J.; HORAK, I.; CRAFFORD, D.; et al. The efficacy of a generic doxycycline tablet in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, doi: 10.4102/jsava.v86i1.1193, 2015.
- FOURIE, J.J.; LUUS, H.G.; STANNECK, D.; et al. The efficacy of Advantix® to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite*, doi: 10.1051/parasite/2013037, 2013.
- FRAGA, D.B.; PACHECO, L.V.; BORJA, L.S.; et al. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rk28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detction of false-positive dogs. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, doi: 10.1371/journal.pntd.0004333. eCollection, 2016.
- FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT,E.; et al. Advantagens of real-time PCR assay for diagnostis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.
- FRANCISCHETTI, I.M.; SA-NUNES, A.; MANS B. J.; et al. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.*, v. 14, n. 1, p. 2051–2088, 2009.
- FREITAS, G.C.; VEADO, J.C.C.; CARREGARO, A.B. Testes de avaliação de injúria renal precoce em cães e gatos. *Sem: Cien. Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 411-426, 411-426, 2014.
- FREITAS, J.C., NUNES-PINHEIRO, D.C., LOPES-NETO, B.E.; et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

- FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Vet. Res.*, v. 1983, p. 2407-2411, 1983.
- FUKUMOTO, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; et al. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int. J. Parasitol.*, v. 9, p. 1031-1035, 2005.
- GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B.; et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/1756-3305-3-33, 2010.
- GENARO, O. *Leishmaniose visceral canina experimental*. 1993. 202f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 1993.
- GIANNELLI, A.; RAMOS, R.A.; DI PAOLA, G.; et al. Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.*, v. 196, n. 1-2, p. 1-5, 2013.
- GIANOPOULOS, A.; MYLONAKIS, M.E.; THEODOROU, K.; et al. Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 2, p. 281-290, 2016.
- GIUNCHETTI, R.C., MAYRINK, W., CARNEIRO, C.M.; 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. 269-277, 2008.
- GOLDSTEIN, R.E.; BROVIDA, C.; FERNÁNDEZ-DEL-PALACIO, M.J.; et al. Consensus recommendations for treatment of dogs with serology positive glomerular disease. *J. Vet. Intern. Med.*, doi: 10.1111/jvim.12232, 2013.
- GOMES, L.A.; MORAES, P. H.; DO NASCIMENTO, L.C.; et al. Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 7, n. 6, p. 1061-1066, 2016.
- GONÇALVES, L.R.; FILGUEIRA, K.D.; AHID, S.M.; et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014.
- GONDIM, L.F.; KOHAYAGAWA, A.; ALENCAR, N. X.; et al. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Vet. Parasitol.*, v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.
- GONEN, L.; STRAUSS-AYALI, D.; SHKAP, V.; et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.*, v. 122, n. 2, p. 131-139, 2004.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epid.*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GOO, Y. K.; JIA, H.; ABOGE, G.O.; et al. Characterization of the *Babesia gibsoni* 12-KDa protein as potential antigen for the serodiagnosis. *Parasitol. Int.*, v. 1, p. 55-60, 2009.
- GOSSET, K.A.; TURNWALD, G.H.; KEARNEY, M.T.; et al. Evaluation of gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio from spot samples of urine supernatant as an indicator of urinary enzyme excretion in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 48, n. 3, p. 455-457, 1987.

- GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M.R.; SOARES, J.F. et al. *Rangelia vitalli*, *Babesia spp.*, and *Ehrlichia spp.* in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 2, p. 172-178, 2016.
- GOYENA, E.; PÉREZ-CUTILLAS, P. ; CHITIMIA, L. et al. A cross-sectional study of the impact of regular use of insecticides in dogs on canine leishmaniasis seroprevalence in southeast Spain. *Prev. Vet. Med.*, v. 124, n. 1, p. 78-84, 2016.
- GRAUER, G.F.; THOMAS, C.B.; EICKER, S.W. Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, n. 10, p. 2116-2119, 1985.
- GREENE, C.E. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. 1387 p.
- GRIMALDI, G.Jr.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based in Dual-Path-Platform (DPP® CVL rapid test) for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.
- GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*), *Am. J. Vet. Res.*, v. 7, p. 937-940, 1975.
- GUERRA, L.L., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C.; et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, v. 104, n. 3, p. 611-622, 2008.
- GUIMARÃES, A.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; SANTA-ROSA, I.C. A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. *Cli. Vet.*, v. 41, n. 1, p. 60-62, 2002.
- HAMET, D., SHUKULLARI, E., RAPTI, D.; et al. Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. Blood pathogens and seroprevalences of parasitic and other infectious agents. *Parasitol. Res.*, v. 2, p. 489-499, 2016.
- HARRUS, S e WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J.*, p. 3, p. 292-296, 2011.
- HARRUS, S., KASS, p. H., KLEMENT, E., WANER, T. Canine monocytic erlichiosis: a retrospective of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Vet. Rec.*, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.
- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Vet. J.*, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011.
- HARRUS, S.; WARNER, T. Diagnosis of canine monocytotropic erlichiosis (*Erlichia canis*): An overview. *J. Vet.*, v. 187, n. 1, p. 292-296, 2011.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *J. Infect. Dis.*, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.
- HARVEY, T.V.; GUEDES, p. E.; OLIVEIRA, T.N.; et al. Canine hepatozoonosis in southeastern Bahia, Brazil. *Genet. Mol. Res.*, doi: 10.4238/gmr.15038623, 2016.
- HEEB, H.L.; WILKERSON, M.J.; CHUN, R.; et al. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. *J. of the Anim. Hosp. Ass.*, v. 39, n. 4, p. 379-384, 2003.

- HEGARTY, B.C.; DE PAIVA, p. P.D.; BRADLEY, J.M.; et al. Clinical relevance of annual screening using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP 3Dx) for canine ehrlichiosis. *J. of the Anim. Hosp. Ass.*, v. 45, n. 3, p. 118-124, 2009.
- HEGARTY, B.C.; MAGGI, R.G.; KOSKINEN, p. ; et al. *Ehrlichia muris* infection in a dog from Minnesota. *J. Vet. Inter. Med.*, v. 26, p. 1217-1220, 2012.
- HEGARTY, B.C.; QUROLLO, B.A.; THOMAS, B.; et al. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-015-0929-8, 2015.
- HEYMAN, p. ; DUH, D.; VAN DER KUYLEN, B.; et al. Molecular and serological evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia sp.* infection in a dog imported in Belgium, from Southern Spain. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v. 5, p. 276-279, 2007.
- HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; et al. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <ftp://geofp.ibge.gov.br/cartas_e_mapas/mapas_para_fins_de_levantamentos_estatisticos/censo_demografico_2010/mapas_municipais_estatisticos/es/alegre_v2.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- IBBA, F.; MANGIAGALLI, G.; PALTRINIERI, S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *Vet. J.*, v. 210, p. 89–91, 2016.
- IGARASHI, I.; WAKI, S.; ITO, M.; et al. Role of CD4⁺ T cells in the control of primary infection with *Babesia microti* in mice. *J. Protozool. Res.*, v. 4, n. 1, p. 164–171, 1994.
- IGBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 7; 1658-1662, 1994.
- IGUCHI, A.; SHIRANAGA, n. ; MATSUU, A.; et al. Efficacy of Malarone® in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 9, p. 1291-1295, 2014.
- IKEDA- GARCIA, F.A.; CIARLINI, p. C.; FEITOSA, M.M.; et al. Perfil hematológico de cães com naturalmente infectados por *Leishmaniose chagasi* no Município de Araçatuba, São Paulo: estudo retrospectivo de 191 casos. *Clin. Vet.*, v. 71, n. 1, p. 42-47, 2003.
- IKEDA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; et al. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Brazilian. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2007.
- IKEDA, G.F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnósticos da leishmaniose visceral canina. *Clin. Vet.*, v. 62, n. 1, p. 32-38, 2006.
- INOKUMA, H.; FUJI, K.; MATSUMOTO, K.; et al. Demonstration of *Anaplasma* of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet. Parasitolol.*, v. 110, n. 1-2, p. 145-152, 2002.
- INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, p. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 4219-4221, 2000.

- IRIS. International Renal Interest Society. IRIS Staging of CKD (modified 2015). Substaging by Proteinuria. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/about/projects_cpk.html. Acesso em: 02 Set 2016.
- IRWIN, p. J.; HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. *Aust. Vet. J.*, v,68, n. 6, p. 204-209, 1991.
- JARDIM, W.R.; CARDOSO, A.P.; OLIVEIRA, J.C.S.; et al. Aspectos clínicos e laboratoriais da leishmaniose visceral no Município de Caxias, MA. *News Lab*, v. 122, n. 1, p. 96-104, 2014.
- JEFFERIES R.; RYAN, U.M.; JARDINE, J. et al. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust. Vet. J.*, v. 11, p. 459-463, 2007.
- JIMÉNEZ, C. M.; PÉREZ, O.C.; VADO, S.I.; et al. Serological survey of *Ehrlichia canis* in stray dogs from Yucatan, Mexico, using two different diagnostic tests. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v. 9, n. 2, p. 209-212, 2009.
- JOHNSON, E.M.; EWING, S.A.; BARKER, R.W.; et al. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales:Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, v. 2-4, 277-288, 1998.
- JONGEJAN, F.; DE VOS, C.; FOURIE, J.J.; et al. A novel combination of fipronil and permethrin (Frontline Tri-Act®/Frontect®) reduces risk of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* and of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-015-1207-5, 2015.
- KAUEWMONGKOL, G.; MANEESAAY, p. ; SUWANNA, n. ; et al. First detection of *Ehrlichia canis* in cerebrospinal fluid from a thrombocytopenic dog with meningoencephalitis by Broad-Range PCR, *J. Vet. Interm. Med.*, v. 1, p. 255-259, 2016.
- KAUR, p. ; DESHMUKH, S.; SINGH, R.; et al. Para-clinico-pathological observations of insidious incidence of canine hepatozoonosis from a mongrel dog: a case report, *J. Parasit. Dis.*, v. 36, n. 1, p. 135-138, 2012.
- KELLY, p. J.; LUCAS, H.; LOFTIS, A.; et al. Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies. *Plos One*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2013.
- KELLY, p. J.; XU, C.; LUCAS, H. et al. Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0053450, 2013
- KER, H.G.; COURA-VITAL, W. AGUIAR-SOARES, R.D.O. et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin. Vac. Immun.*, v. 20, n. 12, p. 1792-1798, 2013.
- KIM, C.M.; YI, Y.H.; YU, D.H.; et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, p. 5766-5776, 2006.
- KIRMIZIS, D.; EFSTRATIADIS, G.; ECONOMIDOU, D.; et al. MPGN secondary to Lyme disease, *Am. J. Kidney. Dis.*,v.43, n. 3, p. 544-551, 2004.
- KLEDMANEE, K.; SUWANPAKDEE, S.; KRAJANGWONG, S.; et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia spp* and

- Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v. 40, n. 1, p. 35-39, 2009.
- KLOPFER, U.; NEUMANN, F.; NOBEL, T.A.; et al. *Hepatozoon canis* infection dogs in Israel. *Refu. Vet.*, v. 30, n. 1, p. 116-120, 1973.
- KONGKLIENG, A.; INTAPAN, p. M.; BOONMARS, T.; et al. Detection of *Babesia canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in canine blood by a single-tube real-time fluorescence resonance energy transfer polymerase chain reaction assay and melting curve, *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 27, n. 2, p. 191-195, 2015.
- KONGKLIENG, A.; THANCHOMNANG, T.; INTAPAN, p. M.; et al. Detection of *Ehrlichia canis* in canine blood samples by real-time fluorescence resonance energy transfer (FRET) PCR and melting curve analysis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v. 5, p. 1149-1156, 2014.
- KONTOS, V. I.; ATHANASIOU, L.V. Use of enrofloxacin in the treatment of acute canine ehrlichiosis. *Canine Pract.*, v.23, p. 10-14, 1998.
- KONVALINKA, A. Urine proteomics for acute kidney injury prognosis: another player and the long road ahead. *Kidney Int.*, v. 85, n. 4, p. 735-738, 2014.
- KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet. Pathol.*, v. 5, n. 2, p. 527-538, 2014.
- KOUTINAS, A.F.; SCOTT, D.W.; KANTOS, v. ; et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.*, v. 3, n. 3, p. 121-130, 1992.
- KRAWCZAK, F.S.; REIS, I.A.; SILVEIRA, J.A.G., et al. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods?. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 48, p. 64-68, 2015.
- KULES, J.; DE TORRE-MINGUELA, C.; BARIĆ RAFAJ, R.; et al. Plasma biomarkers of SIRS and MODS associated with canine babesiosis. *Res. Vet. Sci.*, v. 105, p. 222-228, 2016.
- KUMAR, A.; VARSHNEY, J.P.; VARSHNEY, v. P. Endocrine dysfunction in chronic severe ehrlichiosis with or without babesiosis in dogs. *Vet. Res. Commun.*, v.8, p. 911-916, 2006.
- LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.; et al. A preliminar investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 143, n. 1-2, p. 189-195, 2007.
- LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clín. Vet.*, v. 30, p. 24-32. 2001.
- LAI, T.H.; PARRAGA, M.E.; ALVAREZ, E.; et al. *Anaplasma platys* immunoblot test using major surface antigens, *Vet. Borne Zoonotic Dis.*, v. 9, p. 581-587, 2016.
- LARANJEIRA, D.F.; DA MATTA, v. L.R.; TOMOKANE, T.Y.; et al. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area, *Rev. Saúd. Pub.*, v. 48, n. 4, p. 563-570, 2014.

- LASTA, C.S.; SANTOS, A.P.; MESSICK, J.B.; et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Detecção molecular de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães do sul do Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v, 22 n.3 p.360-366, 2013.
- LATROFA, M.S.; DANTA-TORRES, F.; DE CAPRARIIS, D.; et al. Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1545-y, 2016.
- LAURENTI, M.D.; DE SANTANA, L.M.V.; TOMOKANE, T.Y. et al. Comparative evaluation of the DPP(®)CVL rapid test for canine serodiagnosis in área of visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 205, n. 3-4, p. 444-450, 2014.
- LAVOUÉ, R.; TRUMEL, C.; SMETS, p. M.; et al. Characterization of proteinuria dogue de Bordeaux dogs, a breed predisposed to familial glomerulonephropathy: a retrospective study. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0133311, 2015.
- LEES, G.E.; HELMAN, R.G.; HOMCO, L.D.; et al. Early diagnosis of familial nephropathy in English Cocker spaniels. *J. Am. Hosp. Assoc.*, v. 34, n. 3, p. 189-195, 1998.
- LEMONS, T.D.; CERQUEIRA, A.M.; TOMA, H.K.; et al. Detection and molecular characterization of piroplasma species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 2, p. 137-142, 2012.
- LEVINE, n. D. *Erdhardornia* n. g., *Ascogregarina polynesiensis* n. sp., *Eimeria golemaskii* n. sp., *Isospora tamariscini* n. sp., *Gregarina kazumii* n. nom., new combinations of complications and remendations in names of apicomplexin species. *J. Protozool.*, v. 32, n. 1, p. 359-363, 1984.
- LIN, M.Y.; HUANG, H.P. Use of doxycycline-enrofloxacin-metronidzole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni*. *Acta Vet. Scand.*, v. 24, p. 52-57, 2010.
- LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. of North Am. Small Anim. Pract.*, v. 40, n. 6, p. 1121-1140, 2010.
- LIU, M.; RUTTAYAPORN, n. ; SAECHAN, v. ; et al. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand, *Parasitol. Int.*, v. 4, p. 357-361, 2016.
- LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; et al. Detection of *Leishmaniasia infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techiques. *Vet. Parasitol.*, v. 43, n. 1, p. 10-17, 2012.
- LÓPEZ, L.; VENTEO, A.; AGUIRRE, E.; et al. Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against *Ehrlichia canis*. *J. of Vet. Diag. Inv.*, v. 19, n. 6, p. 635-642, 2007.
- LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zen Fuer Vet. Med.* , v. 43, n. 8 p.469-474, 1996.
- LOSADA-BARRAGÁN, M.; CAVALCANTI, A.; UMAÑA-PEREZ, A.; et al. Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples, *Vet. Parasitol.*, v. 226, p. 57-64, 2016.

- LUCIANO, R.L.; MOECKEL, G.; PALMER, M.; et al. Babesiosis-induced acute kidney injury with prominent urinary macrophages, *Am. J. Kidney. Dis.*, v. 62, n. 4, p. 801-805, 2013.
- M'GHIRBI, Y.; GHORBEL, A.; AMOURI, M.; et al. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Parasitol. Res.*, v. 104,n.4, p. 767-774, 2009.
- MACINTIRE, D.K.; VINCENT-JOHNSON, n. ; DILJON, A.R.; et al. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989-1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 210, n. 7, p. 916-922, 1997.
- MAGGI, R.G.; BIRKENHEUER, A.J.; HEGARTY, B.C.; et al. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasitol. Vect.*, v. 7, n. 1, p. 127-134, 2014.
- MAGGI, R.G.; MASCARELLI, p. E.; HAVENGA, L.N.; et al. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and candidatus *Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian, *Parasite Vectors*, v. 6, p. 103-106, 2013.
- MAIA, C., CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.
- MAIA, C., RAMADA, J., CRISTÓVÃO, J.M.; et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using diferentes tissues. *Vet. J.*, v. 179, n. 1,p.142-144, 2009.
- MALHEIROS, J.; COSTA, M.M.; DO AMARAL, R.B.; et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 7, n. 5, p. 893-900, 2016.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; et al. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.
- MANDAL, M.; BANERIEE, p. S.; KUMAR, S.; et al. Development of recombinant BgP12 based enzyme linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 169, p. 27-33, 2016.
- MANDAL, M.; BANERJEE, p. S.; KUMAR, S.; et al. Development and evaluation of serodiagnostic assays with recombinant BgSA1 of *Babesia gibsoni*. *Vet. Parasitol.*, v. 205(3-4), p. 483-489, 2014.
- MANDAL, M.; BANERJEE, p. S.; KUMAR, S.; et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Vet. Parasitol.*, doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.008, 2015.
- MANZILLO, v. F.; MUCCIO, T.; CAPPIELLO, S.; et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Plos Neg Trop Dis*, v. 7, n. 5, p. 1-9, 2013.
- MANZILLO, v. F.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; et al. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v. 158, n. 20, p. 690-694, 2006.
- MARCHETTI, v. LUCAS, G.; BANETH, G.; et al. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 38, n. 1, p. 121-125, 2009.

- MARCONDES, M. *Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina*. 2008. 154f. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araçatuba, 2008.
- MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunop.*, v. 48, n. 3-4, p. 209-220, 1995.
- MATEI, I. A.; D’AMICO, G.; YAO, p. K.; et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1443-3, 2016.
- MÁTHÉ, A.; DOBOS-KOVÁCS, M.; VÖRÖS, K. Histological and ultrastructural studies of renal lesions in *Babesia canis* infected dogs treated with imidicarb. *Acta Vet. Hung.*, v. 55, n. 4, p. 511-523, 2007.
- MATSUU, A.; ONO, S.; IKADAI, H.; et al. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 6, p. 569-573, 2005.
- Mc CAUSLAND, F.R.; NIEDERMAIER, S.; BIJOL, v. ; et al. Lyme disease-associated glomerulonephritis. *Dial. Transplant. Nephrol.*, v. 26, n. 9, p. 3054-3056, 2011.
- MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; et al. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 8 n. 4 p.441-447, 1996.
- McCLURE, CROTHERS, M.L.; SCHAEFER, J.J. et al. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 12, p. 5012-5020, 2010.
- McCOW, M.E.; ALLEMAN, A.; SAYLER, K.A.; et al. Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. *J. Spec. Oper. Med.*, v. 4, p. 81-85, 2014.
- MEDEIROS, C.M.O.; MELO, A.G.C.; LIMA, A.K.F.; et al. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciê. Anim.*, v. 18, n. 1, p-43-50, 2008.
- MEINKOTH, J.H.; HOOVER, J.P.; COWELL, R.L.; et al. Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 195, n. 12, p. 1754-1755, 1989.
- MELO, A.L.; WITTER, R.; MARTINS, T.F.; et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil, *Med. Vet. Entomol.*, v. 1, p,112-116, 2016.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G. et al. Evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay, an Immunofluorescent Antibody Test and 2 rapid tests (immunochromatographic Dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic leishmanial infections in dogs. *J. Clin. Microb.*, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.
- MINERVINO, A.H.; LIMA, J.T.; SOARES, H.S., et al. Seroprevalence of tick-borne pathogens and tick infestation in dogs from Tapirapé and Karajá indigenous communities, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v. 7, p. 412-418, 2015.
- MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; et al. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trend Parasitol.*, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

- MIRÓ, G.; CHECA, R.; PAPANINI, A.; et al. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-015-0825-2, 2015.
- MOMO, C.; JACINTHO, A.P.; MOREIRA, P. R.; et al. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Med. Inter.*, v. 2014 n.1, p. 1-5, 2014.
- MOONARMART, W.; SUNGPRADIT, S.; RANWANGCHUE, T.; et al. Clinical history and hematological findings among canines with monocytic ehrlichiosis, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v. 1, p. 157-166, 2014.
- MOONEY, C.T.; SHIEL, R.E.; DIXON, R.M.; et al. Thyroid hormone abnormalities and outcome in dogs with non-thyroidal illness, *J. Small Anim. Pract.*, v. 49, n. 1, p. 11-16, 2008.
- MORAES, H.A.; ALMOSNY, n. R.P.; LABARTHE, n. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados com *Ehrlichia spp.* *Clin. Vet.*, v. 9, n. 48, p. 28-30, 2004.
- MORAES, p. H.; RUFINO, C.P.; BARAÚNA, A.R.; et al. Molecular characterization of *Babesia vogeli* in dogs from Belém northern Brazil. *Genet. Mol.*, v. 4, p. 16364-16371, 2016.
- MOREIRA, S.M., BASTOS, C.V., ARAÚJO, R.B., SANTOS, M., PASSOS, L.M.F. Estudo retrospectivo (1998-2001) em erliquiose canina em Belo Horizonte, MG, Brasil, *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.
- MOREIRA, S.M., MACHADO, R.Z., PASSOS, L.F. Detecção de *Ehrlichia canis* em aspirados de medula óssea de cães infectados experimentalmente, *Ciênc. Rural*, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.
- MOROFF, S.; SOKOLCHIK, I.; WOODRING, T.; et al. Use of an automated system for detection of canine serum antibodies against *Ehrlichia canis* glycoprotein 36. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 26, n. 4, p. 558-562, 2014.
- MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preference of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.
- MUNDIM, A.V.; MORAIS, I.A.; TAVARES, M.; et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 153, n. 1-2, p. 3-8, 2008.
- MURATA, T.; INOUE, M.; TATEYAMA, S.; et al. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, n. 5, p. 867-868, 1993.
- MYLONAKIS M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet. Microbiol.*, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.
- MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; et al. Chronic canine erlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J. Am. An. Hosp. Ass.*, v. 40, n. 3, p. 174-184, 2004.

- MYLONAKIS, M.E.; KRITSEPI-KONSTANTINOOU, M.; DUMLER, J.S.; et al. Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J. Vet. Inter. Med.*, v. 24, p. 633-638, 2010.
- MYLONAKIS, ME.; SIARKOU, v. I.; LEONTIDES, L.; et al. Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Microbiol.*, v. 138, n. 3-4., 390-393, 2009.
- NAIR, A.D.; CHENG, C.; GANTA, C.K.; et al. Comparative experimental infection study in dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS One*, e0148239, 2016.
- NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; et al. Canine ehrlichiosis:clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciênc. Rural*, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.
- NALUBAMBA, K, S.MUDENDA, n. B, NAMWILA, M.M. et al. A study of naturally acquired canine babesiosis caused by single and mixed *Babesia* species in Zambia: clinicopathological findings and case management, *J. Parasitol. Res.*, doi: 10.1155/2015/985015, 2015.
- NAUCKE, T.J.; AMELUNG, S.; LORENTZ, S.; et al. First report of transmission of canine leishmaniasis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany, *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1551-0, 2016.
- NELSON, R.W. Distúrbios da glândula tireoide. In: NELSON, R.W; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. São Paulo: Elsevier, 2015. p.740-775.
- NICOLATO, R.C.; ABREU, R.T.; ROATT, B.M.; et al, A.B. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. 1-6, 2013.
- NIWETPATHOMWAT, A. A retrospective study of the therapeutic efficacy of doxycycline on concurrent canine ehrlichiosis and babesiosis in a veterinary hospital population. *Comp. Clinic. Pathol.*, v. 15, p. 215-219, 2006.
- NOLI, C. leishmaniasis canina. *Walt Foc*, v. 9, n. 2, p. 16-24,1999.
- NUNES, C. M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.R.; et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* , v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; et al. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd dog and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.
- O'DWYER, L.H. Brazilian canine hepatozoonosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 20, n. 3, p. 181-193, 2011.
- O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; PEREIRA DE SOUZA, J.C. e al. *Hepatozoon canis* infection associated with dogs ticks of rural áreas of Rio de Janeiro Sate, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.
- O'DWYER, L.H.; SAITO, M.E.; HASEGAWA, M.Y.; et al. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo State, Brazil. *Parasitol. Res.*, v. 94, n. 3, p. 240-242, 2004.

- O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L. *Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose*. In: ALMONSKY, n. R.P.; MASSARD, C.L.; LABARTHE, n. V. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses.*, Rio de Janeiro. L.F. Livros, v. 1, p. 13-56, 2002.
- OLANO, J.P.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses. *Med. Clin. North Am.*, n. 2, v. 86, p. 375-392, 2002.
- OLIVEIRA, L.P.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO L.C.M.; et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* v.15, Supl. 2, p. 55-56, 2009.
- OLIVEIRA, R.S.; CUNHA, R.C.; MORAES-FILHO, J. et al. Recombinant gp19 as a potential antigen for detecting anti-*Ehrlichia canis* antibodies in dog sera. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 3, p. 290-297, 2015.
- OLIVEIRA, T.M.; FURUTA, p. I.; DE CARVALHO, A.; et al. 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. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S.; et al. Diagnosis of *Heptozoon canis* young dogs by cytology and PCR, *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/1756-3305-4-55, 2011.
- OYAFUSO, M.K.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; et al. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná1 Characterization of ticks infecting dogs in a hospital population in North Paraná, Brazil. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v. 23, p. 71-74, 2002.
- PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; LUBAS, G.; et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.
- PANTCHEV, n. ; PLUTA, S.; HUISINGA, E. et al. Tick-borne diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian dogs: status quo and review of distribution, transmission, clinical findings, diagnostics and prophylaxis, *Parasitol. Res.*, v. 114, 19-54, 2015.
- PARADIS, M.; SAUVÉ, F.; CHAREST, J.; et al. Effects of moderate to severe osteoarthritis on canine thyroid function. *Can. Vet. J.*, v. 5, n. 1, p. 407-412, 2003
- PAROLA, P. ; CORNET, J. P.; SANOGO, Y.O.; et al. Detection of *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Rickettsia spp.*, and other eubacteria in ticks from the Thai Myanmar border and Vietnam. *J Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 1600-1608, 2003.
- PASA, S.; VOYVODA, H.; KARAGENC, T.; et al. Failure of combination therapy with imidocarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection in dogs. *Parasitol. Res.*, v. 109, n. 3, p. 919-926, 2011.
- PASHMAKOVA, M.B.; BISHOP, M.A.; STEINER, J.M.; et al. Evaluation of serum thyroid hormones in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*, v. 24, n. 3, p. 264-271, 2014.
- PASSOS, L.M.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.; et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 1, p. 81-85, 2005.

- PAULAN, S.C.; LINS, A.G.S.; TENÓRIO, M.S.; et al. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.*, v. 22 n.1 p.162-166, 2013.
- PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.
- PELEG, O.; BANETH, G.; EYAL, O.; et al. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Parasitol.*, v. 173, n. 3-4, p. 292-299, 2010.
- PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; et al. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. New York Acad. Scienc.*, v. 1078, n. 1 p. 110-117, 2006.
- PEREZ, M.; RIKIHISA, Y; WEN, B. *Ehrlichia canis* –like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.
- PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet. Immun. Immunop.*, v. 69, n. 2-4, p. 121-126, 1999.
- PINHANELLI, v. C.; COSTA, p. N.; SILVA, G.; et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Ehrlichia canis* DNA in naturally infected dogs using the p30 gene. *Genet. Mol. Res.*, v. 4, p. 17885-17892, 2015.
- POLZIN, D.J. Chronic kidney disease in small animal, *Vet Clin Anim*, v. 41, n. 1, p. 15-30, 2011.
- PREZIOSI, D. E.; COHN, L. A. The increasingly complicates story of *Ehrlichia*. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. *Vet. Lear. Syst.*, v. 24, n. 4, p. 277-288, 2002.
- PREZIOSI, D. E.; COHN, L. A. The increasingly complicates story of *Ehrlichia*. *Compend Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 24, n. 4, p. 277-288, 2002.
- QUARESMA, F.P.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C.; et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real time PCR. *Act. Trop.*, v. 111, n. 1, p. 289-294, 2009.
- QUINNEL, R.J.; CARSON, C.; REITHINGER, R. et al. Evaluation of rK39 rapid test for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS – Negl. Trop. Dis.*, v. 7, n. 1, e. 1992, 2013.
- QUROLLO, B.A., CHANDRASHEKAR, R., HEGARTY, B.C, et al. A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infect. Ecol. Epidemiol.*, doi: 10.3402/iee.v4.24699. eCollection 2014.
- RAFAJ, R.B.; KULES. J.; SELANEC, J. Markers of coagulations activation, endothelial Stimulation, and inflammation in Dog with Babesiosis. *J. Vet. Inter. Med.*, v. 22, n. 1, p. 1172-1178, 2013.

- RAMOS C.A., RAMOS, R.A., ARAÚJO, F.R.; et al. Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 1, n. 58, p. 58-62, 2009.
- RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol. Res.*, v. 5, p. 1115-1120, 2010.
- RAMSEY, I.K.; GUNN-MOORE, D.; SHAW, S. Sistemas Hematopoiético e Linforreticular. In: Manual de doenças infecciosas em cães e gatos. Editora Roca, p. 69-94, 2010.
- RAMSEY, I.K.; GUNN-MOORE, D.; SHAW, S. *Sistemas Hematopoiético e Linforreticular*. In: *Manual de doenças infecciosas em cães e gatos*. Editora Roca, São Paulo, p. 69-94, 2010.
- RAVNIK, U.; TOZON, n. ; SMERDEL, K.S.; et al. Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Vet. Microbiol.*, v. 149, n. 1-2, p. 172-176, 2011.
- REIS A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.
- [REIS](#), A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immun.*, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006.
- REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.
- RESENDE, L.A.; AGUAR-SOARES, R.D.; GAMA-KER, H.; et al. Impacto f LbSapSal vaccine in canine immunological and parasitological features before and after *Leishmania chagasi* challenge, *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0161169, 2016.
- RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH, A. DE O.; MOUTA-CONFORT, E.; et al. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania)* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 148, n. 3-4, p. 200-6, 2007.
- RIVERS, B.J.; WALTER, p. A.; O'BRIEN, T.D. et al. Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic tool in an experimental modelo of aminoglycoside-induced acute renal failure in dog, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 32, n. 4, p. 323-336, 1996.
- RJEIBI, M.; AMAIRIA, S.; ROUATBI, M. et al. Molecular prevalence and genetic characterization of piroplasms in dogs from Tunisia. *Parasitology*, v. 12, p. 1622-1628, 2016.
- ROLLA, D.; CONTI, n. ; ANSALDO, F.; et al. Post-infectious glomerulonephritis presenting as acute renal failure in a patient with Lyme disease, *J. Renal Ini. Prev.*, v. 3, n. 1, p. 17-20, 2013.
- RONDELLI, M.C.H. *Avaliação adrenocortical, tireideana e do estresse oxidativo de cães naturalmente infectados por Ehrlichia canis*. 2015. 111 f. Tese (Doutorado em Medicina

Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2015.

ROTONDANO, T.E.; ALMEIDA, H.K.; KRAWCZAK, F.S.; et al. Survey of *Erlichia canis*, *Babesia spp.* And *Hepatozoon spp.* In dogs from a semiarid region of Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 1, p. 52-58, 2015.

ROTONDANO, T.E.; DE ALMEIDA, A.M.; LUSTOSA, E.M.; et al. An assesment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis, *Scientific World Journal*, doi: 10.1100/2012/605743, 2012.

RUDOLER, n. ; BANETH, G.; EYAL, O.; et al. Evaluation of na attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, v. 1, p. 226-233, 2012.

RUDOLER, n. ; HARRUS, S.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; et al. Comparison of the acute phase protein and antioxidante responses in dogs vaccinated against canine monocytic ehrlichiosis and naive-challenged dogs, *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-015-0798-1, 2015.

RUDZINSKA, M.A.; TRAGER, W.; LEWENGRUB, S.J.; et al. An electron microscopic of *Babesia microti* invading erythrocytes. *Cell. Tissue. Res.*, v. 169, n. 3, p. 323-334, 1976.

RUEBUSH, M.J.; HANSON, W.L. Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. *Cell. Immunol.*, v. 52, n. 2, p. 255-265, 1980.

RUFINO, C.P.; MORAES, p. H.; RIS, T.; et al. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. *Vet. Borne Zoon. Dis.*, v. 13, n. 12, p. 846-850, 2013.

RUNGSIPAT, A.; MADOKA, O.; KUMPOOSIRI, n. ; et al. Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. *Comp. Clin. Pathol.*, v. 18, n. 1, p. 13-22, 2009.

SAKUMA, M.; NAKAHARA, Y, SUZUKI, H.; et al. A case report: a dog with acute onset of *Hepatozoon canis* infection. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 71, n. 6, p. 835-838, 2009.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; SANCHEZ, A.; et al. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J. Hered.*, v. 96, n. 7, p. 755-758, 2005.

SANOGO, Y.; DAVOUST, B.; INOKUMA, H.; et al. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) collected from dogs in África. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 70, p. 205–212, 2003.

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

SANTAMARIA, A.; CALZADA, J.E.; SALDAÑA, A.; et al. Molecular diagnosis and species identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in dogs from Panama, Central America. *Vet. Borne Zoon. Dis.*, v. 14, n. 5, p. 1-3, 2014.

SANTARÉM, v. A.; JOSÉ, M.D.; LAPOSY, C.B. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. *Semin: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 4, p. 845-852, 2008.

- SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immun. Immunop.*, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, 2002.
- SANTOS, A.S.; ALEXANDRE, n. ; SOUSA, R.; et al. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet. Res.*, v. 164, n. 6, p. 168-171, 2009.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L. et al., Molecular evaluation of incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet. J.*, v. 1, p. 145-148, 2009.
- SANTOS, S.O.; ARIAS, J.R.; HOFFMANN, M.P.; FURLAN, M.B.; FERREIRA, W.F PEREIRA, C.; FERREIRA, L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul state. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 5, p. 633-634. 2003.
- SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. *Bol. Epid. Paulista*, v. 4, n. 39, p. 27-39, 2007.
- SARMA, K.; MONDAL, D.B.; SARAVANAN, M.; et al. Ultrasonographic changes in dogs naturally infected with borne intracellular diseases. *J. Parasit. Dis.*, v. 40, n. 2, p. 248-251, 2016.
- SASANELLI, M.; PARADIES, p. ; GRECO, B.; et al. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods, *Vet. Parasitol.*, v. 171, v. 3-4, 194-199, 2010.
- SCHAARSCHMIDT, D.; TRACHESEL, M.; ACHERMANN, R.; et al. Importance of PCR for the diagnostics of canine babesiosis. *Schweiz Arch. Tierheilkd*, v. 148, n. 12, p. 633-640, 2006.
- SCHALM, O.W.; SMITH, R.; KANEKO, J.J. Plasma protein: fibrinogen ratios in dogs, cattle and horse. Part 1. Influence of age on normal values and explanation of use in disease, *Calif. Vet.*, v. 24, p. 9-11, 1970.
- SCHARIDOMICHELAKIS, M. N.; XENOULIS, p. G. CHATZIS, M.K. et al. Thyroid function in 36 dogs with leishmaniasis due to *Leishmania infantum* before and during treatment with allopurinol with or without meglumine antimonate, *Vet. Parasitol.*, v. 197, n. 1-2, p. 22-28, 2013.
- SCHOEMAN, J.P.; REES, p. ; HERRTAGE, M.E. Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by *Babesia canis rossi*. *Vet. Parasitol.*, v. 2, p. 75-82, 2007.
- SCHOTTHOEFER, A.M.; MEECE, J.K.; IVACIC, L.C.; et al. Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization. *J. Clin. Microbiol.*, v. 51, n. 7, p. 2147-2153, 2013.
- SCHTTERS, T.P.; MOUBRI, K.; COOKE, B.M.; et al. Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: a review. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 2, p. 75-78, 2009.
- SCORPIO, D.G.; WACHTMAN, L.M.; TUNIN, R.S.; et al. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to

- Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. *J. of Am. Ass. Lab. An. Sci.*, v. 47, n. 5, p. 23-28, 2008.
- SHIGEMATSU, H.; SHATNEY, C.H. The effect of triiodothyronine (T3) and reverse triiodothyronine (rT3) on canine hemorrhagic shock. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, v. 89, n. 10, p. 1587-1593, 1988.
- SHIMOKAWA, M.T.; UMEKI, S.; BABA, K. et al. Neutropenia associated with osteomyelitis due to *Hepatozoon canis* infection in a dog. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 73, n. 1, p. 1389-1393, 2011.
- SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TARGET, L.; et al. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.*, v. 153, n. 1-2, p. 131-138, 2008.
- SIEW, E.D.; WARE, L.B.; IKIZLER, T. A. Biological markers of acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 22, p. 810-820, 2011.
- SILVA, B.A.; CANSECO, p. S.; TORRE, G.L.M; et al. Asymptomatic human infection from contact dogs: a case of human ehrlichiosis. *Gac. Med. Mex.*, v. 150, n. 2, p. 171-174, 2014.
- SILVA, C.B.; SANTOS, H.A.; NAVARRETE, M.G.; et al. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba. *Ticks Tick Borne Dis.*, 5, p. 938-944, 2016.
- SILVA, D. A.; MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; et al. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 57, n. 5, p. 435-438, 2015.
- SILVA, M.L.; COSTA, C.A.; CINTRA, C.A.; et al. Alterações glomérulo-tubulares em cães infectados por *Ehrlichia canis*. *Invest*, v. 14, n. 6., p. 17-21, 2015.
- SILVA, R.C.; RICHINI-PEREIRA, v. B.; KIKUTI, M. et al. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Vet. Q.*, v. 24: 1-21, 2016.
- SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A, et al. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 9, p. 1537-1541, 1991.
- SLADE, D.J.; LEES, G.E.; BERRIDGE, B.R.; et al. Resolution of a proteinuric nephropathy associated with *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 47, n. 6, p. 138-144, 2011.
- SMITH, T e & KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. *Bur. Anim. Indust., U.S. Dept. Agric.*: 177-304, 1893.
- SOLANO-GALLEGO. L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- SOLLANO-GALLEGO, L., CAPRI, A., PENNISI, M.G., et al. Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasit. Vectors*, v. 10, p. 216-218, 2015.
- SOLORZANO, G.T.M.; MADUREIRA, M.V.M.; MOREIRA, S.R.; et al. Relação proteína/creatinina na urina versus proteinúria de 24 horas na avaliação de nefrite lúpica. *J. Bras. Nefrol.*, v. 34, n. 1, p. 64-67, 2012.

- SONODA, M.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; et al. Estudo retrospectivo de casos caninos de leishmaniose atendidos na cidade de São Paulo, Brasil (1997-2007). *Sem: Ciênc. Agr.*, v. 34, n. 2, p. 741-758, 2013.
- SOUSA, K.C.M.; SOUSA, M.; ANDRÉ, M.R.; et al. Detecção molecular e sorológica de patógenos transmitidas por carrapatos em cães de uma área endêmica de *Leishmania infantum* em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bra. Parasitol. Vet.*, v. 22, n. 4, p. , 2013.
- SOUSA, v. R.F.; ALMEIDA, A.B.P.F.; BARROS, L.A.; et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciênc. Rural*. V.40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.
- SPARAGANO, O.A.; DE VOS, A.P.; PAOLETTI, B.; et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 15, p. 527-534, 2003.
- SPOLIDORIO, M.G.; MINERVINO, A.H.; VALADAS, S.Y.; et al. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 2, p. 214-219, 2013.
- SPOLIDORIO, M.G.; TORRES, M.M.; CAMPOS, W.N.S.; et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 20, n. 3, p. 253-255, 2011.
- STANNECK, D.; FOURIER, J.J. Imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% collars (Seresto®, Bayer) successfully prevent long-term transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dog. *Parasitol. Res.*, v. 1, p. 21-32, 2013.
- STILLMAN, B.A.; MONN, M.; LIU, J.; et al. Performance of commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *J. Am. Vet. Assoc.*, v. 245, p. 80-86, 2014.
- SUDHAKARA, R.B.; SIVAJOTHI, S.; VARAPRASAD, R.L.S., et al. Clinical and laboratory findings of *Babesia* infection in dogs. *J. Parasit. Dis.*, v. 2, p. 268-272, 2016.
- SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y.; HANCOCK, S.I.; et al. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 5, p. 453-462, 2001.
- TABOADA, J.; MERCHANT, S.R. Babesiosis of companion animals and man. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, v. 21, n. 1, p. 103-123, 1991.
- TAENZLER, J.; LIEBENBERG, J.; ROEPKRE, R.K.; et al. Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs after topical administration of fluralaner spot-on solution. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1481-x, 2016.
- TANGALIDI, M.K.; OIKONOMIDIS, I.L.; PSALLA, D. et al. Nodular granulomatous glossitis as the sole clinical sign in canine leishmaniasis, *Vet. Clin. Pathol.*, doi: 10.1111/vcp.12416, 2016.
- TANIKAWA, A.; LABRUNA, M.B.; COSTA, A.; et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. *Res. Vet. Sci.*, v. 94, n. 3, p. 474-477, 2013.

- TANNUS, M. M.; RODRIGUES., F. H.; MASTRANTONIO, E. C.; et al. Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três espécies de *Leishmania*. *Horiz. Cient.*, v. 1, n. 1, p. 1–28, 2007.
- THEODOURO, K.; MYLONAKIS, M.E.; SIARKOU, v. I., et al. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 7, p. 1619-26, 2013.
- THOMAS, S. Development of structure-Based vaccines for erlichiosis. *Methods Mol. Biol.*, v. 1403, p. 519-534, 2016.
- THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; et al. Hematologia e Bioquímica-Clínica Veterinária. 2ª d. São Paulo: Roca, 2015, 427p.
- TOOM, M.L.; DOBAK, T.P.; BROENS, E.M.; et al. Interstitial pneumonia and pulmonary hypertension associated with suspected ehrlichiosis in a dog. *Acta Vet. Scand.*, doi: 10.1186/s13028-016-0228-1, 2016.
- TORRECILHA, R.B.; UTSUNOMIYA, Y.T.; BOSCO, A.M.; et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev. Vet. Med.*, v. 132, p. 83-87, 2016.
- TRAPP, S.M.; DACNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.*, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.
- TRÓIA-DE-ABREU.; R., CARVALHO, M.D.; CARNEIRO, C.M.; et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *leishmania (Leishmania) chagasi*. *PloS One*, v. 6, n. 5, p. 1-7, 2011.
- UENO, T.E.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; et al. *Ehrlichia canis* in dogs attended in a veterinary hospital from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 3, p. 57-61, 2009.
- UILENBERG, G.; FRANSSEN, F.F.; PERIÉ, n. M.; et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and proposal for nomenclature. *Vet. Q.*, v. 1, p. 33-40, 1989.
- VAN DER HARTS, M.R.; BULL, S.; LAFFONT, C.M.; et al. Gentamicin nephrotoxicity a comparison of in vitro findings with in vivo experiments in equines, *Vet. Res. Commun.*, v. 29, n. 3, p. 247-261, 2005.
- VANNIER, E.; GEWURZ, B.E.; KRAUSER, p. J. Human babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, v. 22, n. 3, p. 469-488, 2008.
- VARGAS, H.G.; ANDRÉ, M.R.; FARIA, J.L.; et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet. Parasitol.*, v. 186, n. 3-4, p. 254-260, 2012.
- VASCELLARI, M.; RAVAGNAN, S.; CARMINATO, A.; et al. Exposure to vector-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy. *Parasit. Vectors*, doi: 10.1186/s13071-016-1639-6, 2016.
- VERCAMMEM, F.; DE DEKEN, R.; MAES, L. Duration of protective immunity experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. *Vet. Parasitol.*, v. 68, n. 1-2, p. 51-55, 1997.

- VIEIRA, R.F.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.; et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.
- VIEIRA, R.F.C.; VIERIRA, T.S.W.J.; NASCIMENTO, D.A.G.; et al. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in rural settlement from Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.55, n. 5, p. 335-340, 2013.
- VILLAESCUSA, A.; GARCÍA-SANCHOS, M.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; et al. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. J.*, v. 3, p. 263-268, 2015.
- VIOL, M.A.; GUERRERO, F.D.; DE OLIVEIRA, B.C.; et al. Identification of leishmania spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitol. Res.*, v. 115, n. 9, p. 3479-3484, 2016.
- VON KLPMANN, T.; BOETTCHER, I.C.; ROTERMUND, A., et al. Euthyroid sick syndrome in dogs with idiopathic epilepsy before treatment with anticonvulsant drugs. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 20, n. 3, p. 516-522, 2006.
- WANG, G.; WORMSER, G.P.; ZHUGE, J.; et al. Utilization of a real-time PCR assay for diagnosis of *Babesia microti* infection in clinical practice, *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 3, p. 376-382, 2015.
- WARNER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 69, n. 3-4, p. 307-317, 1997.
- WATANABE, M.; OIKAWA, T.; HIRAOKA, H.; et al. Experimental inoculation of beagle dogs with *Ehrlichia* species detected from *Ixodes ovatus*. *Vet. Parasitol.*, v. 136, n. 2, p. 147-154, 2006.
- WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, p. R.; et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Ann. Rev. Immun.*, v. 25, p. 821-852, 2007.
- WHO. World Health Organization. *Magnitude of problem, 2006*. Disponível em: <www.who.int/en/index.html>. Acesso em: 20 jun. 2010.
- WITTER, R.; VECCHI, S.N.; PACHECO, T.A.; et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitoses em Cuiabá, Mato Grosso. *Semin: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 3811-3822, 2013.
- WOODROFFE, R.; PRAGER, K.C.; MUNSON, L.; et al. Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*). *PLoS ONE*. V.7, n. 1, p. 1-9, 2012.
- WOZNIAK, E.J.; BARR, B.C.; THOMFORD, J.W.; et al. Clinical, anatomic, and immunopathologic characterization of *Babesia gibsoni* infection in the domestic dog (*Canis familiaris*), *J. Parasitol.*, v. 83, n. 4, p. 692-699, 1997.
- YAMASAKI, M.; ASANO, H.; OTSUKA, Y.; et al. Use of canine red blood cell with high concentrations of potassium, reduced glutathione, and free amino acid as host cells for in vitro cultivation of *Babesia gibsoni*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 61, n. 12, p. 1520-1524, 2000.

YANG, Y.S.; MURCIANO, B.; MOUBRI, K.; et al. S Structural and Functional Characterization of Bc28.1, Major Erythrocyte-binding Protein from *Babesia canis* Merozoite Surface. *J. Biol. Chem.*, v. 287, n. 12, p. 9495-9508, 2012.

YOAK, A.J.; REECE, J.F.; GEHRT, S.D.; et al. Disease control through fertility control:secondary benefits of animal birth control in Indian street dogs. *Prev. Vet. Med.*, v. 1, p. 152-156, 2014.

ZANETTE, M.F.; LIMA, v. M.F.; LAURENTI, M.D.; et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* testes in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

ZHOU, J.; YANG, J.; ZHANG, G.; et al. *Babesia gibsoni*: An apical membrane antigen-1 homologue and its antibody response in the infected dogs. *Exp. Parasitol.*, v. 114, n. 4, p. 329-333, 2006.

ZYGNER, W.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; BASKA, p. ; et al. Low T3 syndrome in canine babesiosis associated with increased sérum IL-6 concentration and azotaemia. *Vet. Parasitol.*, v. 1-2, p. 23-27, 2015

ZYGNER, W.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; WESOLOWSKA, A.; et al. Urinary creatinine to serum creatinine ratio and renal failure index in dogs infected with *Babesia canis*. *Acta Parasitol.*, v. 3, p. 297-303, 2013.

10. APÊNDICES

10.1. Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA
SETOR: PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ tutor (a) do
cão _____, da raça _____, com idade de
_____, autorizo que meu animal seja submetido à coleta de sangue e
urina e permito que seja incluído no Projeto de Pesquisa intitulado “Doenças transmitidas por
vetores em cães nas regiões rural e urbana do sul do Espírito Santo: Identificação, prevalência,
alterações clínico-laboratoriais e fatores de riscos associados, sob a supervisão do Prof. Dr.
Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

Local e data

Assinatura do Tutor

10.2. Apêndice 2 – Ficha de avaliação física

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA
 SETOR: PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Identificação de cães com Leishmaniose e Hemoparasitoses nas regiões rural e urbana da cidade de Alegre-ES

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO Animal Nº _____

Data da coleta ____/____/____

Nome do animal: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: F M

Tutor: _____ Tel: _____

Endereço: _____

Med. Veterinário _____ Clínica Veterinária: _____

FICHA CLÍNICA

HISTÓRICO CLÍNICO:

Origem do cão: Recolhido na Rua Doméstico Canil

Vacinação: V8 V10 Raiva Não Vacinado

Vermifugação: Sim Não Alimentação: Caseira Ração Ambos

EXAME GERAL:

Peso: _____ Temperatura: _____ TPC: _____ Desidratação: _____

Score corporal: Normal/ Ideal Caquético Magro Gordo Obeso

Coloração de Mucosas: Normocoradas Pálidas Ictéricas Hiperêmicas Cianóticas

Linfonodos*: ___ Mandibular ___ Pré Escapular ___ Poplíteo ___ Inguinal ___ Axilar

* linfonodo: Descrever se alterado: A – Aumentado D- Diminuído

Frequência cardíaca: _____ Frequência Respiratória: _____

EXAME DOS SISTEMAS:

Respiratório: Secreção nasal Epistaxe Crepitação Sibilos Abafamento Pneumonia

Gastrointestinais: Diarreia vômito hepatomegalia Esplenomegalia

Oftálmicos: Conjuntivite Secreção ocular Hifema Uveíte

Neurológico: Ataxia ___ Paralisia/plegia* Inclinação de cabeça Nistagmo Convulsão andar em círculos

* Paralisia/plegia: U- Unilateral B-Bilateral T- Torácico P- Pélvico

EXAME DOS SISTEMAS:

Músculo - Esquelético: Emaciação Claudicação Aumento de volume articular

Dermatológico: Alopecia Hipotricose Crostas Descamação Feridas Onicogribose

Urinário: Hematúria Poliúria Polaquiúria Disúria

Genital- Hemorragias: Vagina Prepúcio Pênis

Distúrbios de coagulação: Petéquias Equimose Sufusões Melena Hematêmese

Outros: Apatia Anorexia/Hiporexia Emagrecimento

Faz uso de alguma medicação? Qual? _____

O cão já foi atendido por um médico Veterinário? _____

Observações: _____

10.3. Apêndice 3 – Ficha de fatores de risco epidemiológico

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA
 SETOR: PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Identificação de cães com Leishmaniose e Hemoparasitoses nas regiões rural e urbana da cidade de Alegre-ES.

FICHA DE FATORES DE RISCO EPIDEMIOLÓGICO Animal Nº _____

Data ____/____/____

Nome do animal: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: F M

Tutor: _____ Tel: _____

Endereço: _____

Med. Veterinário _____ Clínica Veterinária: _____

IDENTIFICAÇÃO

Região de Habitação: Urbana Rural

Local de Habitação: Casa Apartamento Sítio Outro-Qual? _____

Forma de Criação: Com acesso a rua Com acesso livre a rua Com acesso supervisionado a rua

Acesso a áreas rurais-ex: sítio/chácara

No momento da consulta apresentou ectoparasitas? Não Sim- Qual?

Sarna Carrapato Pulga Piolho

Apresentou carrapato nos últimos 12 meses? Sim Não Não sabe

Realiza algum método preventivo contra carrapato? Sim Não Não sabe

Utiliza algum método curativo contra carrapato? Sim Não Não sabe

O tutor (a) já foi picado por carrapato? Sim Não

O cão já foi suspeito de Hemoparasitose nos últimos 12 meses? Sim Não Não sabe

O cão já foi tratado para Hemoparasitose? Sim* Não Não sabe

* se sim: o tratamento foi realizado até o final? Sim Não Não sabe

O cão é o único animal da casa? Sim Não*

*se não - Os outros animais são da mesma espécie? Sim Não- Qual? _____

Algum ser humano que tem contato com o cão foi diagnosticado com alguma hemoparasitose?

Não Sim- Qual? _____