

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMILA NOGUEIRA DE FARIA

**Positividade de *Leishmania* sp e *Ehrlichia* sp em cães sintomáticos
atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia**

UBERLÂNDIA- MG

2018

CAMILA NOGUEIRA DE FARIA

**Positividade de *Leishmania* sp e *Ehrlichia* sp em cães sintomáticos
atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial à
obtenção do grau de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Sydnei Magno da
Silva

Coorientadora: Dra. Juliana Silva Miranda

UBERLÂNDIA- MG

2018

CAMILA NOGUEIRA DE FARIA

**Positividade de *Leishmania* sp e *Ehrlichia* sp em cães sintomáticos
atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial à obtenção do
grau de Médica Veterinária.

Uberlândia, ____ de _____ de 2018.

Banca Examinadora

Doutora Juliana Silva Miranda
Coorientadora (ICBIM – UFU)

Professora Doutora Sofia Borin Crivelenti
Examinadora (FAMEV – UFU)

Professora Doutora Michelle Aparecida Ribeiro Freitas
Examinadora (ICBIM– UFU)

**Uberlândia - MG
2018**

“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”

Mahatma Gandhi

DEDICATÓRIA

À minha avó Luiza *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por me abençoar a cada passo e por estar ao meu lado sempre.

À minha mãe por me passar sua serenidade e sua fé. Ao meu pai de quem herdei o amor pelos animais.

À minha família por acreditarem em mim, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas e desde de cedo por me ensinarem o certo e o errado. Sem vocês nada seria possível.

À minha amiga, Larissa Pandeló por toda amizade, incentivo e carinho. Você é minha referência como médica veterinária.

Ao meu orientador Prof. Sydnei pelo apoio, compreensão, incentivo e investimento.

A minha coorientadora, desde o princípio, pela sua paciência e ensinamentos, assim como uma mãe ensina um filho a dar seus primeiros passos.

Ao pessoal do Laboratório *de Bioensaios em Leishmania*, especialmente aos colegas: Iasmim, Marco, Karen, Gabriela, Eliana, Douglas e Camila pela ajuda nesse projeto e também pelos momentos de descontração.

A toda equipe do Hospital Veterinário da UFU pela parceria, apoio e paciência, em especial à Solange e a Raquel sempre dispostas a ajudar.

RESUMO

Diferentes doenças que acometem os cães transmitidas por vetores (DCTVs) têm adquirido grande relevância na clínica veterinária devido ao aumento da frequência com o decorrer dos anos. As doenças transmitidas por vetores como erliquiose e leishmaniose são afecções de potencial zoonótico e de caráter peculiar em Uberlândia-MG. São enfermidades de difícil controle e grande enfoque na medicina veterinária, responsáveis por manifestações clínicas graves, sendo o diagnóstico parte fundamental para o estabelecimento de prognóstico e tratamento apropriados e prevenção de novos casos. A detecção do DNA das formas parasitas auxilia no diagnóstico e possibilita o tratamento mais rápido e adequado, permitindo assim a melhora da qualidade de vida do animal, além de minimizar a possibilidade do mesmo se tornar um reservatório. Nesse trabalho foi realizado um estudo das taxas de positividade em animais suspeitos para erliquiose e leishmaniose do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HVET-UFU) no período de fevereiro a maio de 2018. Foram coletadas 70 amostras dentre os animais suspeitos atendidos na rotina clínica do HVET-UFU, sendo que a detecção do DNA da forma parasita foi realizada por PCR direcionada à região 16S rRNA para *Ehrlichia* sp e à região do kDNA de *Leishmania* sp. Desta análise foi verificado que 55% destes animais estavam positivos para erliquiose, 42% positivos para leishmaniose e 21% apresentaram coinfeção. Observou-se que ambas doenças estão distribuídas por todas regiões de Uberlândia-MG com maior frequência de erliquiose no Setor Leste e de leishmaniose no Setor Norte. Já em relação às alterações clínicas/hematológicas como esplenomegalia, linfadenopatia, hipertemia, anemia e trombocitopenia foi verificado que elas estavam presentes mesmo nos animais negativos para erliquiose e leishmaniose não sendo assim sintomas patognomônicos dessas e sim alterações que podem estar presentes em várias doenças. Por isto, estas alterações não ofereceram suporte para o diagnóstico confiável e diferencial entre elas. Portanto, faz-se necessário a análise não só das características clínicas/hematológicas, mas também do exame molecular, ferramenta de suma importância como método diagnóstico complementar e final.

Palavras chave: Leishmaniose canina; Erliquiose canina; Achados clínicos / Hematológicos Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

Canine vector-borne diseases have become more significant in the veterinary clinical pathology due to the increase frequency over the years. Vector-borne diseases (e.g. ehrlichiosis and leishmaniasis) are zoonotic potential diseases, and presents a peculiar character in Uberlândia-MG. They are difficult to control and responsible for serious clinical manifestations; therefore, they are a great focus on the veterinary medicine, and the diagnosis is fundamental for the establishment of an appropriate prognosis and treatment to prevent new cases. The detection of parasite DNA helps with the diagnosis and allows a faster and more adequate treatment. Consequently, it allows an improvement of the animal's life quality, minimizing the possibility of becoming a reservoir host. In this work, a study of the positivity rates in animals which are allegedly contaminated with ehrlichiosis and leishmaniasis of the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia (HVET-UFU) was executed from February to May 2018. Seventy samples were collected from the animals assisted in the HVET-UFU routine. The DNA detection of the parasite was performed by PCR targeting 16S rRNA region for *Ehrlichia* sp and kDNA region for *Leishmania* sp. From this analysis it was verified that 55% of these animals were positive for ehrlichiosis, 42% positive for leishmaniasis and 21% presented co-infection. It was also observed that both diseases are distributed in all regions of Uberlândia-MG with a higher frequency of ehrlichiosis at the eastern area and leishmaniasis at the northern area. Regarding the clinical and hematological alterations – as splenomegaly, lymphadenopathy, hyperthermia, anemia and thrombocytopenia, it was verified that they occurred even in the negative animals for ehrlichiosis and leishmaniasis; therefore, they are not pathognomonic symptoms of these, but alterations that might be present in several diseases. Thus, these alterations did not support the reliable and differential diagnosis between them. Hence, it is necessary to analyze not only the clinical and hematological characteristics, but also the molecular examination, a tool of extreme importance as a complementary and final diagnostic method.

Keywords: Canine leishmaniasis; Canine ehrlichiosis; Clinical / Hematologic findings
Molecular diagnosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	10
1.2 <i>EHRlichia CANIS</i>	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 CRITÉRIOS ÉTICOS E SELETIVOS	16
4.2 COLETA DE AMOSTRAS	17
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	17
4.4 ANÁLISE MOLECULAR	17
4.6 ANÁLISE DOS DADOS	19
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores (DCTV) como anaplasmose, babesiose, erliquiose, hepatozoonose e leishmaniose figuram entre as principais infecções que afetam os cães em todo o mundo e, são enfermidades de difícil controle devido à ampla distribuição dos invertebrados veiculadores (DANTASTORRES; 2011). Dentre as DCTV, a erliquiose monocítica canina (EMC) e a leishmaniose visceral canina (LVC) são transmitidas por carrapatos e flebotomíneos hematófagos, respectivamente. Estas moléstias infecciosas são de difícil controle e apresentam grande enfoque na medicina veterinária, pois são responsáveis por manifestações clínicas graves que podem levar ao óbito do animal acometido. (CORTESE et al., 2010; DA SILVA, 2011).

A EMC e LVC apresentam diagnóstico acurado de difícil realização, sendo o mesmo realizado principalmente por meio da associação das manifestações clínicas com achados laboratoriais (CIARAMELLA et al., 2005). Entretanto, a maioria dos sinais clínicos são similares em diversas doenças infecciosas como nas hemoparasitoses (CIARAMELLA et al., 2005). Além disso, outro obstáculo ocorre quando o canino é infectado com mais de uma DCTV, especialmente em áreas endêmicas para mais de uma enfermidade (MANA et al., 2009).

Já é sabido da relevância da LVC como uma importante zoonose, e tem se destacado também algumas espécies causadoras de erliquiose como possíveis agentes zoonóticos (DAGNONE, et al., 2001). Estudos têm apontado que a ocorrência de EMC concomitante à LVC tem aumentado na população canina e que os animais coinfectados apresentam sintomatologia clínica agravada (CARVALHO 2015).

Diante disto, além do impacto que estas doenças podem causar na saúde do animal, destacamos também que esses microrganismos podem infectar humanos, salientando assim a importância dos cães na epidemiologia da doença humana (UNVER et al., 2001; BLOCH; MCBRIDE, 2010; DAY, 2011, SILVA et al., 2014).

1.1 *Leishmania infantum*

A leishmaniose visceral (LV) é um importante problema da saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle (OMS,1990). É amplamente aceito que a LV é uma doença dinâmica, sendo as circunstâncias da transmissão

continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e ao comportamento humano. Modificações no habitat dos hospedeiros naturais e dos vetores, migrações humanas decorrentes de conflitos, ou condições socioeconômicas precárias têm contribuído para a alteração no panorama epidemiológico da LV (DUNAISKI, 2006).

As manifestações clínicas da LV zoonótica são atribuídas ao protozoário digenético (heteróximo) *Leishmania infantum*, transmitido no Novo Mundo pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* infectadas (WHO, 2010), como esquematizado na Figura 1. O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, durante o qual o parasita se dissemina pelo corpo. Os quadros clínicos da LV são semelhantes em cães e humanos, sendo caracterizados por surtos de febres, tosse, perda de peso, letargia, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia, epistaxe e diarreias (DEL OLMO et al., 2009). É uma doença sistêmica grave que atinge as células do sistema mononuclear fagocitário e órgãos de hospedeiros vertebrados, sendo baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele as regiões mais afetadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

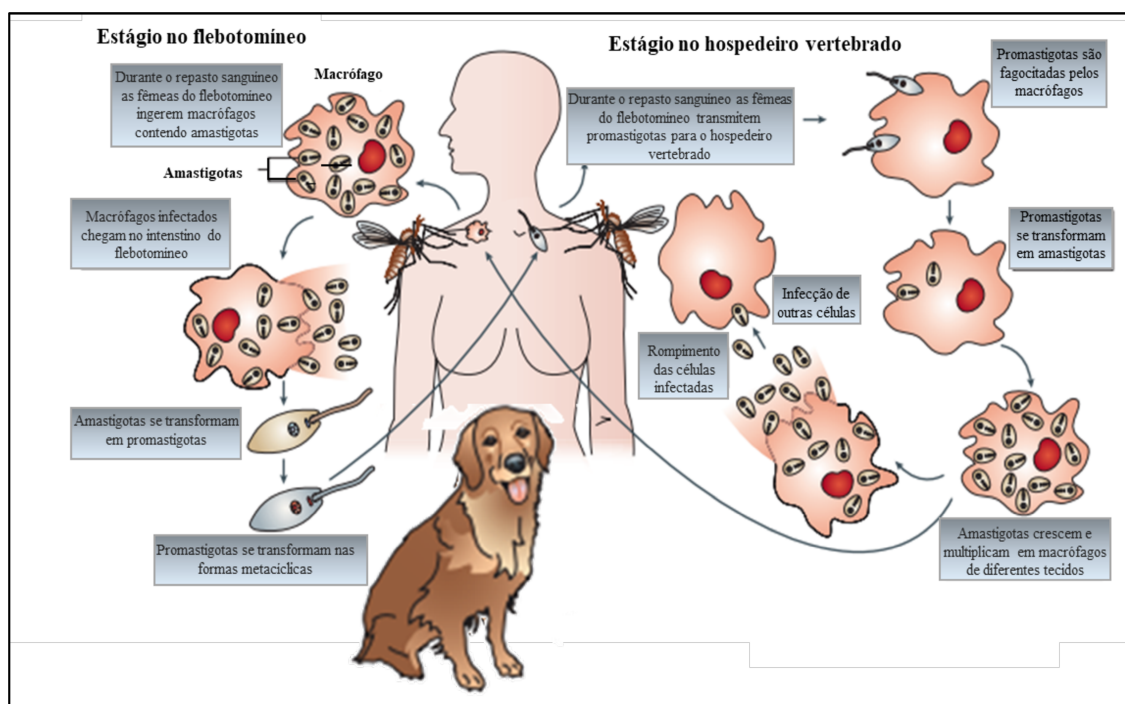


Figura 1. Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp (Adaptado de LIPODOLVÁ; DEMANT, 2006). Os flebotomíneos ingerem macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo. No intestino do vetor as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas, se dividem e migram para a probóscide. Fêmeas do flebotomíneo infectadas realizam repasto sanguíneo e assim as promastigotas são regurgitadas em hospedeiros vertebrados. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas e se transformam dentro dessas células em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares.

Os casos de LV notificados no Brasil representam 90% dos casos de LV nas Américas, e a doença vem se disseminando cada vez mais, sendo endêmica nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, com alta incidência em centros urbanos, como: Belo Horizonte - MG, Fortaleza - CE, São Luís - MA e Campo Grande - MS (WHO, 2010). Apesar das tentativas de controle da LV no país, o número de casos tem aumentado nos últimos anos, com média anual superior a 3.500 casos humanos. Esse fato pode estar associado a baixa eficiência do programa brasileiro de controle da LV, que é composto por medidas como o tratamento dos doentes e controle de reservatórios domésticos e de vetores (COSTA, 2011).

A relação entre a presença de casos caninos e humanos já foi estabelecida, sendo que casos caninos normalmente precedem os casos humanos (OLIVEIRA et al., 2011; DANTAS-TORRES et al., 2012). Além do cão, alguns animais silvestres também são considerados como reservatórios, tais como os canídeos (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2014).

O diagnóstico da LVC é um dos passos essenciais no controle da doença, sendo geralmente realizado por meio de testes sorológicos, com a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro de animais infectados, juntamente com os dados clínicos e epidemiológicos (DA SILVA, 2011).

Além disso, estudos mostram que cães assintomáticos podem se reestabelecer e desenvolver a doença clínica ou permanecer assintomáticos por anos e até mesmo estabelecer a cura espontânea, sendo que alta porcentagem desses cães é soronegativa e, no entanto, apresentam o teste da Reação em cadeia da polimerase (PCR) positivo. (RIBEIRO et al., 2018, DA SILVA, 2011). O diagnóstico molecular realizado é altamente sensível e específico para *Leishmania* e tem como vantagem a utilização de uma grande variedade de amostras, como sangue, aspirados de medula ou linfonodos, biópsias de pele, urina, dentre outros (DA SILVA, 2009).

1.2 *Ehrlichia canis*

A erliquiose canina é causada pela rickettsia *Ehrlichia canis*, intracelular obrigatória, que pode ser encontrada isolada, em colônias compactas ou formando mórulas em

leucócitos mononucleares, sendo transmitida pelo carrapato vermelho, *Rhipicephalus sanguineus* (VINASCO et al., 2007).

O microrganismo é adquirido pelo carrapato durante repasto sanguíneo no cão infectado ou, de uma maneira menos comum, por meio da transfusão sanguínea, quando um cão sem EMC é transfundido com sangue de um animal portador de *E. canis* (SILVA, 2015). As larvas e ninfas se infectam quando alimentam-se no hospedeiro, durante a fase aguda da doença, através da ingestão de leucócitos infectados (SMITH et al., 1976). No carrapato, a bactéria se dissemina por meio dos hemócitos do intestino para a glândula salivar, sendo que a bactéria se mantém somente por transmissão transtadiária (WOODY; HOSKINS, 1991). Portanto, as larvas de *R. sanguineus* podem se infectar pelo agente, mantendo a infecção até o estágio adulto (SMITH et al., 1976). Esse se inicia quando a bactéria é inoculada no cão por meio da saliva contaminada do carrapato. Em seguida, elas são fagocitadas por células mononucleares sob forma de corpúsculos elementares (SANTARÉM, 2003). Uma vez na circulação, esses microrganismos entram nos monócitos por fagocitose e se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira formando inclusões intracelulares denominadas mórulas (WEISS, 2006), o que caracteriza a fase aguda da doença. Nessa fase, ocorre a multiplicação em órgãos como fígado e baço e entre 12 a 17 dias ocorre o aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Os primeiros achados clínicos são febre, anorexia, apatia e febre (HARRUS et al., 2004). Também é observado nesses pacientes, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia em consequência da multiplicação do agente e da hiperplasia de órgãos linfóides (HARRUS et al., 2004).

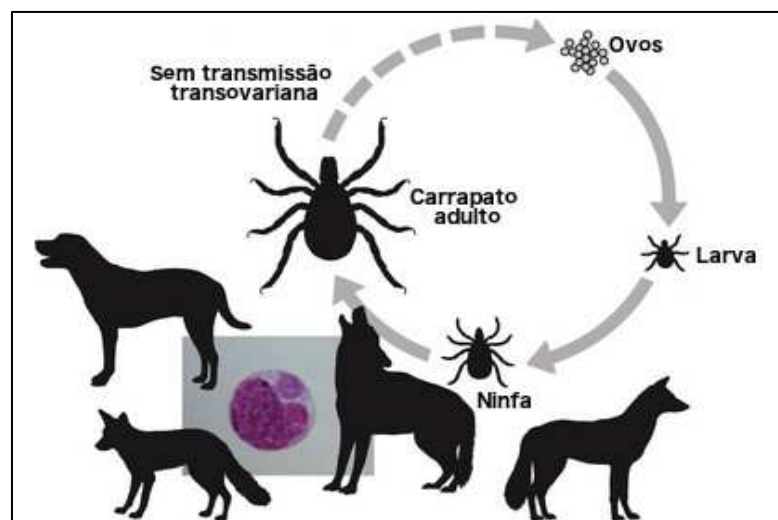


Figura 2. Representação do ciclo de vida de *Ehrlichia* sp (Adaptado de SYKES, 2016). O organismo é transmitido apenas de forma transtadial entre os carrapatos. Canídeos são possíveis reservatórios do patógeno. Uma mórula é mostrada dentro do citoplasma de um monócito.

Considerada uma das doenças infecciosas mais importantes para os cães, a enfermidade tem apresentado ocorrência significativa em vários países da América Latina (UNVER et al., 2001) e estados brasileiros (AGUIAR et al., 2007b). A prevalência de *E. canis* no Brasil varia de 0,12 a 92,31% dependendo da população estudada e do método diagnóstico utilizado. Porém, esta prevalência provavelmente está subestimada, já que poucos cães com infecção aguda de *E. canis* apresentam mórulas em esfregaços sanguíneos (HARRUS et al., 2004).

Os métodos diagnósticos, a região, as condições climáticas e a população estudada afetam a prevalência da EMC no Brasil (DAGNONE et al., 2001; VIEIRA et al., 2011), mas independentemente desses fatores, os casos suspeitos de erliquiose canina representam cerca de 20% dos atendimentos em clínicas e hospitais veterinários do Brasil (MORAIS, 2004). Entretanto, em algumas regiões do Brasil a prevalência de erliquiose ainda é desconhecida.

Em estudo retrospectivo da casuística clínica de erliquiose em cães atendidos entre 1998 e 2001 em Belo Horizonte - MG constatou-se que 15,9% apresentavam *E. canis* no exame parasitológico direto de esfregaço sanguíneo. Já em Uberlândia - MG, Santos et al. (2004a) encontraram positividade de 32% para *Ehrlichia* sp na microscopia.

Segundo Macedo (2007) a erliquiose canina é a patologia mais frequente do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia - MG. Sabe-se que esse município tem fatores que favorecem o aparecimento dessa hemoparasitose como o fator climático favorável, presença do vetor e o elevado número de cães.

A gravidade dessa enfermidade também depende de fatores como imunidade do hospedeiro, idade, raça e presença de infecções concomitantes (VINASCO et al., 2007). Os sinais clínicos na maioria dos casos são inespecíficos, como letargia, febre, anorexia, perda de peso, esplenomegalia, linfadenomegalia sangramento e mucosas pálidas. A descoberta da erliquiose granulocítica da *Ehrlichia sennetsu* (“febre sennetsu”) e o isolamento da *Ehrlichia chaffeensis*, até então tido como específicas de cão, em seres humanos, mostraram que a erliquiose não é apenas um problema médico veterinário (DAGNONE et al., 2001). Recentemente foi descoberto que o agente causador da erliquiose granulocítica humana (EGH) também pode infectar naturalmente várias espécies animais.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido a técnica mais utilizada para diagnóstico da infecção por *E. canis*, desde que foi desenvolvida (RENÉ-MARTELLET et al., 2015). Porém, a PCR tem maior sensibilidade e especificidade para detectar *E. canis*, principalmente em regiões endêmicas ou após o tratamento e, tem sido amplamente utilizada no estudo desta enfermidade (HARRUS et al., 2004). A sorologia permite a detecção com alta sensibilidade nas fases tardias da doença, como nas fases subclínica, crônica e em animais em recuperação. Por outro lado, a técnica PCR geralmente permite a detecção dos cães infectados com o hemoparasita na fase aguda da doença, com maior sensibilidade (NAKAGHI, 2010).

Essas afecções são multissistêmicas e se manifestam de diferentes formas. Logo, conhecer a frequência e correlaciona-las com as manifestações clínicas são de suma importância para possíveis diagnósticos diferenciais. Isso possibilita ao médico veterinário um diagnóstico seguro, precoce e um prognóstico favorável. (CARVALHO et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

As confirmações diagnósticas dessas DCTVs representam um desafio e incluem o histórico de exposição ao vetor, os sinais clínicos compatíveis e a confirmação laboratorial. O diagnóstico acurado é fundamental para o estabelecimento de prognóstico e tratamento adequados, bem como medidas de controle eficazes (CARVALHO, 2015). É notório que os cães estão cada vez mais presentes nas famílias brasileiras, e assim, próximos ao ser humano. Para algumas pessoas essa relação é tão afetuosa quanto a de pais e filhos. Sendo assim, como são afecções de potencial zoonótico e de caráter peculiar em Uberlândia - MG, é necessário que os animais infectados sejam diagnosticados de forma eficiente, e em um segundo momento, que medidas de controle efetivas sejam implantadas na cidade.

A relevância do projeto está em realizar o diagnóstico molecular tanto de *Ehrlichia* sp quanto de *Leishmania* sp, metodologia esta não disponibilizada no Hospital Veterinário Público. E assim, prestar um serviço à população carente atendida no Hospital Veterinário, que na maioria das vezes não teria acesso a esse atendimento em clínicas veterinárias particulares, o que permite um protocolo de tratamento e acompanhamento de forma mais efetiva, propiciando assim o bem-estar do animal, bem como a redução do risco de infecção humana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a positividade a *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HVET-UFU).

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil clínico dos animais suspeitos de erliquiose e leishmaniose atendidos no HVET-UFU no período de fevereiro a maio de 2018;
- Caracterizar o perfil epidemiológico dos animais suspeitos de erliquiose e leishmaniose atendidos no HVET-UFU no período de fevereiro a maio de 2018;
- Determinar a positividade de *Ehrlichia* sp e de *Leishmania* sp nos cães atendidos no HVET-UFU no período de fevereiro a maio de 2018 por meio da técnica PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Critérios éticos e seletivos

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estavam de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e seguiram as diretrizes recomendadas pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal - CEUA/UFU. Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UFU sob protocolo nº 150/16 (Anexo 1).

Os animais incluídos nesse estudo (n = 70) tiveram a prévia anuência dos tutores, sendo os mesmos esclarecidos e convidados a participar do projeto. Cães de todas as raças, ambos os sexos e diferentes faixas etária, atendidos no HVET-UFU no período de fevereiro a maio de 2018 foram avaliados quanto à sintomatologia clínica para erliquiose e/ou leishmaniose. Desses pacientes obtiveram-se as seguintes informações: idade, sexo, raça, bairro, data do atendimento, sinais clínicos e alterações observadas no exame físico e quadro hematológico.

4.2 Coleta de amostras

Os animais sintomáticos receberam número individual e foram identificados pelo número da ficha clínica registrada no HVET-UFU. Residentes responsáveis pelos atendimentos da rotina clínica no HVET-UFU coletaram amostras de 5,0mL de sangue dos animais por punção das veias radial, cefálica ou jugular por meio de agulhas e seringas descartáveis, que foram então transferidas para tubos à vácuo com EDTA.

Esse material foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Clínica HVET- UFU, onde as amostras foram identificadas e, a partir delas, realizou-se esfregaços de sangue periférico em lâmina. Esse material permaneceu armazenado a -20° C até serem encaminhadas ao Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas - UFU, e mantidas à -20° C até serem processadas para a realização do diagnóstico molecular.

4.3 Extração de DNA

As extrações de DNA a partir de sangue coletado com EDTA foram realizadas utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue Kit*® (PROMEGA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo usados cerca de 200µl do sangue coletado. Após a extração, o DNA foi dosado por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) e mantido a - 20° C até a análise molecular.

4.4 Análise Molecular

A amplificação do DNA de *Ehrlichia* sp foi realizado por meio de nested-PCR. As amostras de DNA extraídas a partir do sangue periférico foram amplificadas em termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando-se os *primers*: ECC e ECB na primeira reação o qual amplifica a região 16S rRNA, posteriormente o produto desta primeira reação foi utilizado na segunda reação com os *primers*: HE3 e ECAN que foi desenhado para amplificar a região 16S rRNA, espécie *Ehrlichia canis* (Tabela 1), a reação foi realizada de acordo com Murphy et al., (1998). Os passos de ciclagem foram os seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5min, seguidos por desnaturação a 95°C durante 1min, anelamento 60°C por 1min, extensão a 72° C durante 1min e extensão final a

72°C por 5min. Como controle positivo da reação foi utilizado DNA de amostra positiva e confirmada por diferentes técnicas diagnósticas doado pela professora Julia A. Gonçalves da Silveira da Universidade Federal de Minas Gerais.

A reação de PCR para *Leishmania* sp seguiu o descrito por Rodgers et al. (1990). A amplificação do DNA extraído das amostras foi realizada em termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando-se os *primers* 13A direto e 13B reverso (Tabela 1) que amplificam região conservada do DNA do minicírculo do cinetoplasto do parasito, sendo o fragmento amplificado com aproximadamente 120 pares de bases (pb). A amplificação ocorreu a partir de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 3min; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 60s, anelamento a 51°C por 60s, extensão a 72°C por 30s; e por último, a extensão final a 72°C por 2min (RODGERS et al., 2011). Em todas as reações de PCR para leishmaniose o DNA de *Leishmania* obtido a partir de cultura axênica, foi utilizado como controle positivo da reação.

Como controle negativo das reações tanto para leishmaniose quanto erliquiose foi utilizado amostra de DNA de um cão de 7 meses da raça pug pedigree CBKC, o qual utiliza constantemente coleira antiparasitária (Leevre, Ouro Fino) e que apresentou resultados negativos pelas técnicas de microscopia óptica (esfregaço sanguíneo) e molecular (PCR) para ambas as doenças.

Tabela 1. Informações dos *primers* utilizados na análise molecular.

Micro-organismo	Primer	Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Amplicon	Referência Bibliográfica
Direto:					
<i>Ehrlichia</i> sp	ECC/ECB	16s rRNA	GAACGAACGCTGGCGGCAAGCG	478 pb	MURPHY et al. (1998)
			AACGAACGCTGGCGGCAAGC		
Reverso:					
<i>Ehrlichia canis</i>	ECAN/HE3	16s rRNA	CAATAATTTATAGCCTCTGGCTA	398 pb	MURPHY et al. (1998)
			TAGGAATAGGTACCGTCATTA		
<i>Leishmania</i> sp	13A /13B	kDNA	TCTTCCCTAT	120 pb	RODGERS et al. (1990)
			Direto:		
<i>Leishmania</i> sp	13A /13B	kDNA	TATAGGTACCGTCATTATCTTC	120 pb	RODGERS et al. (1990)
			CCTAT		
Reverso:					
<i>Leishmania</i> sp	13A /13B	kDNA	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTAT	120 pb	RODGERS et al. (1990)
			AGGA		
<i>Leishmania</i> sp	13A /13B	kDNA	Direto:	120 pb	RODGERS et al. (1990)
			GTGGGGGAGGGGCGTTCT		
Reverso:					
<i>Leishmania</i> sp	13A /13B	kDNA	ATTTTACACCAACCCCCAGTT	120 pb	RODGERS et al. (1990)

4.5 Eletroforese

Os produtos amplificados pela técnica PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% ou de poliacrilamida 6% em tampão TBE 1X a tensão de 100V por cerca de 60min, em paralelo às amostras foi adicionado o padrão de peso molecular (Norgen Biotek Corp).

Às amostras aplicadas no gel de agarose 1,5% foi adicionado o reagente Safer dye (Kasvi) e então ao término da eletroforese a visualização das bandas foi feita em fotodocumentador (ImageQuant Gel System, GE Healthcare Life Sciences). O gel de poliacrilamida ao fim da eletroforese foi fixado em etanol 10% e ácido acético 0,5%, corado com nitrato de prata 0,1% e assim os fragmentos de DNA foram evidenciados pela solução reveladora de hidróxido de sódio 3% e formaldeído 3% (DA SILVA et al., 2009).

4.6 Análise dos dados

O cálculo das porcentagens das positivities foi feito pelo software Microsoft Office/Excel 2013. Para a edição e adaptação do mapa de Uberlândia foi utilizado o software Gimp 2.8.22.

5. RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos e clínicos

As informações obtidas dos 70 animais incluídos no estudo foram feitas por meio da análise das fichas clínicas. Obtivemos informações acerca dos dados referentes à idade, ao gênero e a região de origem dos mesmos.

Quanto à sintomatologia dos pacientes, além das informações contidas na Tabela 2 referente aos sinais clínicos e hematológicos dos animais avaliados, foi verificada também informação em relação à queixa principal dos tutores desses animais, sendo que hiporexia e apatia representaram 40% do total.

Tabela 2. Características clínicas e hematológicas dos animais incluídos no estudo e avaliados para *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp.

		<i>Ehrlichia</i> sp (n=20) Positividade %	<i>Leishmania</i> sp (n=11) Positividade %	Coinfecção (n= 19) %	Negativo (n= 20) %	Total
Sinais clínicos	Esplenomegalia	5 (25%)	1 (9,1%)	3 (15,7%)	8 (40%)	17
	Linfoadenopatia	7 (35%)	5 (45,4%)	10 (52,6%)	7 (35%)	29
	Hipertermia*	5 (25%)	2 (18,2%)	5 (26,3%)	7 (35%)	19
Hematologia	Anemia [#]	10 (50%)	5 (45,4%)	11 (57,8%)	11 (55%)	37
	Trombocitopenia ^o	13 (65%)	7 (63,6%)	15 (78,9%)	11 (55%)	46

*: Animais que apresentaram temperatura acima de 39,5°C.

[#]: Animais com idade até 12 meses - hematócrito inferior à 34%; acima de 12 meses - hematócrito abaixo de 37%.

^o: animais que apresentaram número de plaquetas abaixo de 175000/ μ l.

As principais alterações clínicas e hematológicas dos cães estudados foram esplenomegalia, linfoadenopatia (principalmente dos linfonodos poplíteos), hipertermia, anemia (na grande maioria normocítica, normocrômica regenerativa) e trombocitopenia (Tabela 2). Em ambas as doenças, tanto a contagem total quanto a diferencial de leucócitos não demonstrou diferença, de forma que alguns pacientes apresentaram leucopenia, geralmente por neutropenia, outros apresentaram aumento na contagem total de bastonetes ou até mesmo um perfil leucocitário normal (dados não mostrados).

Nos animais coinfectados os sinais clínicos observados foram: 15,7% esplenomegalia, 52,6% linfoadenopatia e 26,3% hipertermia, já em relação às alterações hematológicas perceptíveis 57,8% dos animais apresentaram anemia e 78,9% trombocitopenia.

Os animais que apresentaram positividade para EMC e LVC estavam distribuídos em todos os Setores (Central, Norte, Sul, Leste e Oeste) e 2 distritos da cidade de Uberlândia, sendo que EMC foi detectada em 25 bairros e 2 distritos, já os que apresentaram positividade para LVC estavam distribuídos em 21 bairros e 2 distritos (Tabela 3).

Tabela 3. Dados demográficos dos animais positivos para *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp.

Setores (Nº de bairros)	Nº de bairros com positividade EMC / LVC	Positividade (n) EMC / LVC	Positividade % EMC / LVC	Gênero (%) (feminino / masculino)		Faixa etária (%) (filhote / adulto)	
				EMC	LVC	EMC	LVC
Central n= 11	3 / 1	5 / 2	7,14 / 2,8	0 / 100	0 / 100	0 / 100	0 / 100
Norte n= 16	5 / 7	8 / 9	11,42 / 12,85	50 / 50	75 / 25	12,5 / 87,5	11 / 89
Distritos n= 6	2 / 2	3 / 2	4,28 / 2,8	33 / 67	0 / 100	0 / 100	0 / 100
Sul n= 20	5 / 4	8 / 3	11,42 / 4,28	30 / 70	25 / 75	0 / 100	0 / 100
Leste n= 22	7 / 5	9 / 7	12,85 / 10	20 / 80	42 / 58	0 / 100	0 / 100
Oeste n= 23	5 / 4	6 / 7	8,5 / 10	16 / 84	16 / 84	0 / 100	0 / 100

Todos os animais analisados procederam da cidade ou distritos de Uberlândia-MG, sendo que os mesmos estavam distribuídos em alguns bairros de todos os Setores da cidade conforme Figura 3. Dos animais amostrados observamos que a maior incidência de erliquiose ocorreu na zona leste (12,85%) em que 9 animais estavam positivos dos 70 animais estudados, já a maior ocorrência de leishmaniose foi na zona norte (12,85%) que deteve 9 animais do total de 70 analisados.

Das 70 amostras apenas três (4,3%) procediam de caninos filhotes e apenas uma delas, proveniente da zona norte de Uberlândia estava coinfectada para EMC e LVC. Já nos adultos a positividade foi de 55% para EMC e 42% para LVC. Em relação ao sexo 29 eram de fêmeas e 41 eram de machos. Entre as fêmeas 38% eram positivas para EMC e 41,4% para LVC sendo que 17,2% estavam coinfectados. Dentre os machos 75% foram positivos para EMC, 42,5% para LVC e 35% estavam coinfectados.

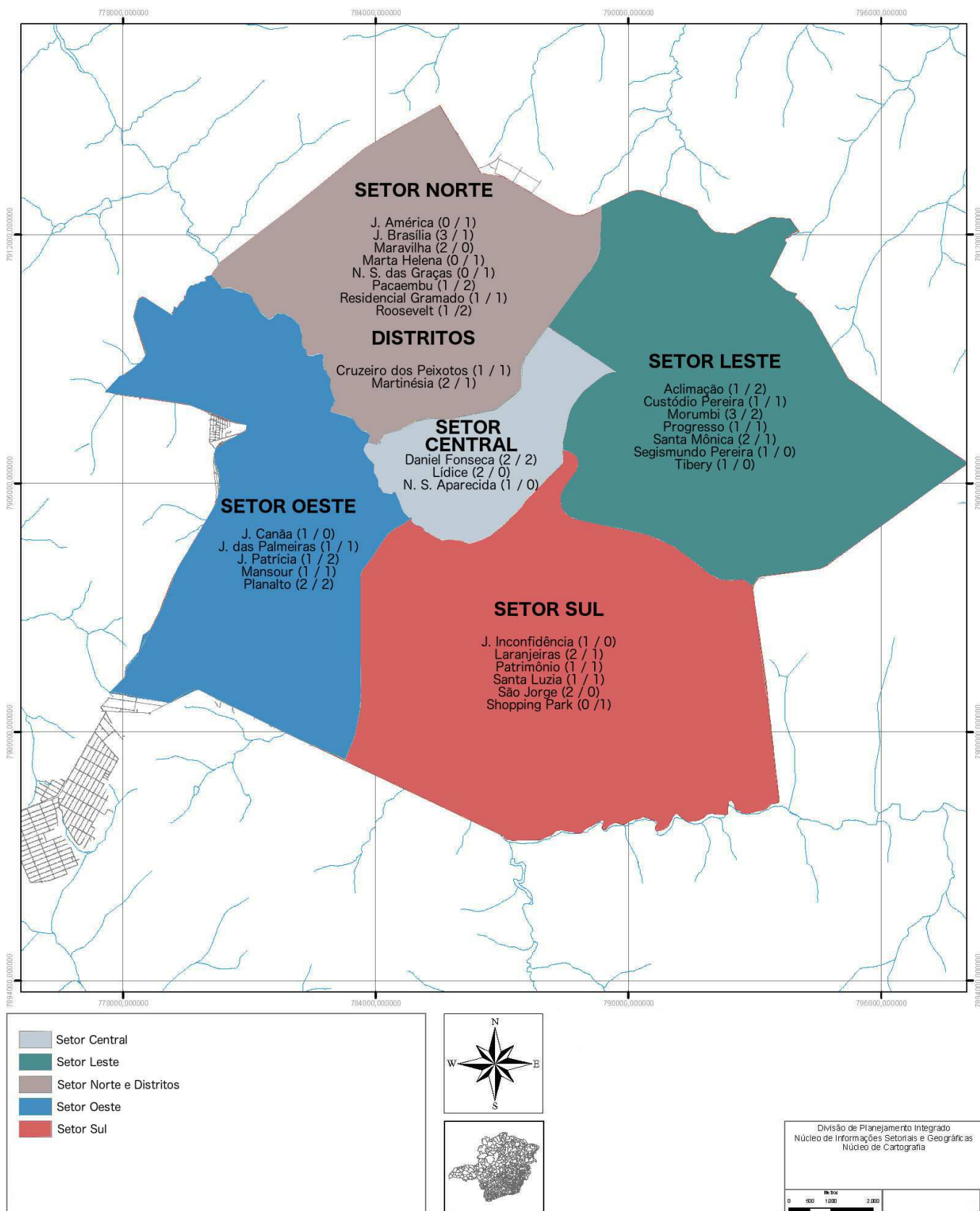


Figura 3. Mapa de Uberlândia setorizado por cor conforme legenda. Os bairros que apresentaram positividade estão listados por Setor com o número de animais positivos para *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp respectivamente.

Adaptado de: <http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms_b_arquivos/14847.jpg>

5.2 Análise molecular

No presente estudo, determinou-se a positividade dos 70 animais, tanto para EMC quanto para LVC por meio da técnica PCR. A amplificação da região 16S rRNA de *Ehrlichia* sp com os iniciadores ECC/ECB na primeira reação, sendo que ECAN/HE3 utilizado na segunda reação amplificam fragmento de aproximadamente 398pb (Figura 4), sendo que entre as amostras testadas 55% apresentaram positividade e 45% foram negativos (Tabela 4).

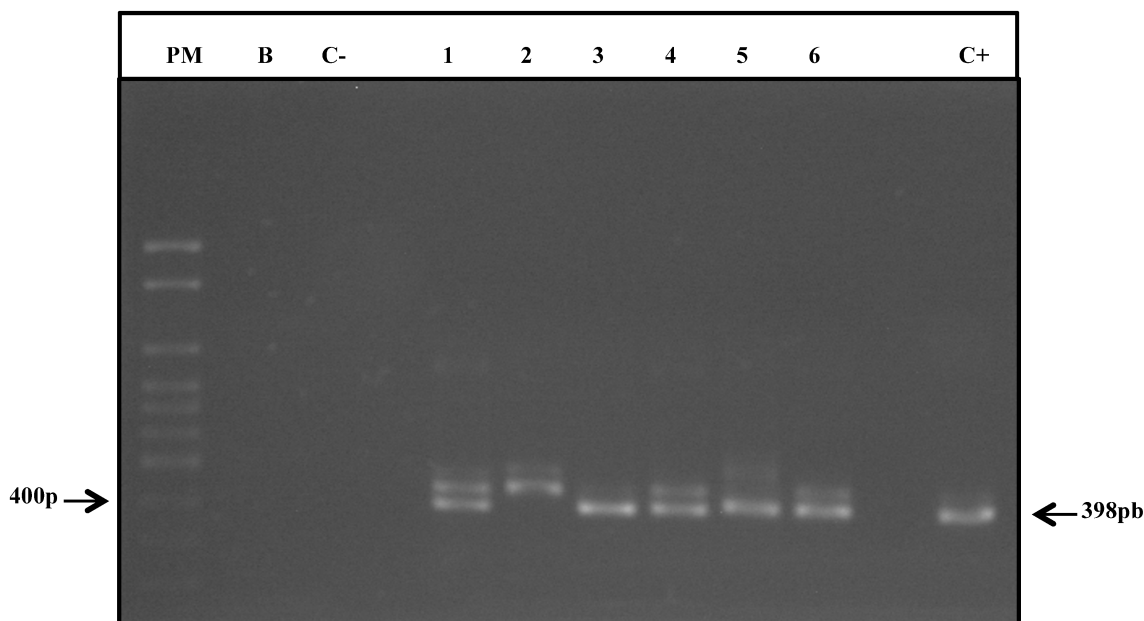


Figura 4. Gel de agarose 1,5% representativo da PCR com o primer ECC/ECB – ECAN/HE3 para *Ehrlichia* sp. PM: peso molecular; C-: controle negativo; 1-6: amostras positivas; C+: controle positivo.

A amplificação da região do minicírculo de kDNA de *Leishmania* sp com os iniciadores 13A/13B gerou fragmento de aproximadamente 120pb para todas as amostras positivas (Figura 5). A PCR com os iniciadores 13A/13B apresentou resultado positivo para 42,85% e negativo para 57,15% (Tabela 4). A análise dos dados de positividade tanto para EMC quanto LVC demonstrou que 27% dos pacientes estudados estavam coinfectados. A positividade de *Ehrlichia* sp e de *Leishmania* sp determinada por PCR está demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4. Positividade de *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp.

Resultado	<i>Ehrlichia</i> sp	<i>Leishmania</i> sp	Total
Positivo	39 (55%)	30 (45%)	70
Negativo	31 (42,85%)	40 (57,15%)	70

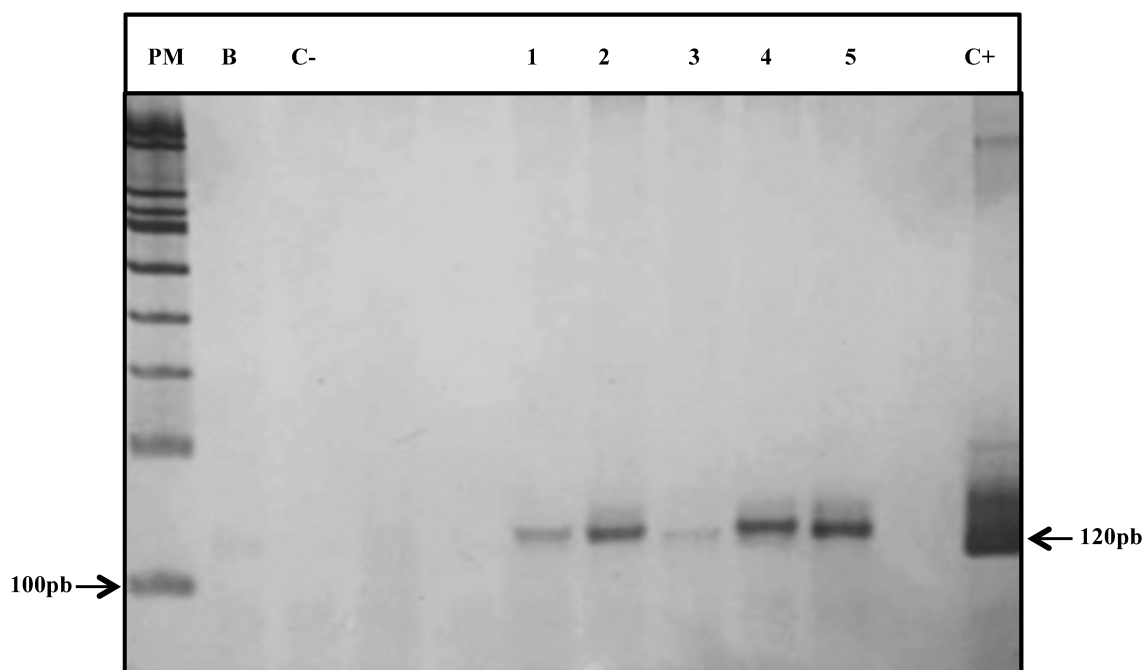


Figura 5. Gel de poliacrilamida 6% representativo da PCR com o primer 13A/13B para *Leishmania* sp. PM: peso molecular, C-: controle negativo; 1: amostra negativa; 2-6: amostras positivas; C+: controle positivo.

6. DISCUSSÃO

Cada vez mais a erliquiose tem se destacado como uma das doenças caninas mais comuns e importantes no país, devido ao aumento da população canina e da ampla distribuição do vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineos* (AGUIAR et al., 2007a). Além disso, essa enfermidade tem adquirido significativa relevância, uma vez que tem ocorrido o estreitamento da relação entre o homem e o cão, com isto estudos já têm demonstrado que algumas espécies causadoras de erliquiose possam ser possíveis agentes zoonóticos (DAGNONE et al., 2001). Outra doença de grande importância é a leishmaniose, já é sabido da grande relevância que o cão possui como reservatório de *Leishmania infantum*, sendo a leishmaniose canina uma das doenças parasitárias de maior relevância no país. Frente a isto, destaca-se o papel que o cão possui no convívio das famílias como potencial fonte de disseminação (DA SILVA, 2011).

Nesta pesquisa foi observado que a EMC e LVC estão distribuídas por todas regiões de Uberlândia-MG, sendo que dos animais analisados que apresentaram sintomatologia grande parte eram de cães adultos. Sugere-se que isso se deva ao fato de que

quanto mais velhos são os pacientes, maior é a possibilidade de serem expostos à carrapatos e a flebotomíneos (ANGEL, 2015).

Silva et al. (2010) observaram que 42,5% dos animais estudados apresentavam infecção por *E. canis* em Cuiabá - MT, entretanto não encontrou nenhuma relação entre raça, gênero, idade e a infecção pelo parasita. Porém, Huxssol et al. (1972) observaram que a maioria dos animais acometidos em um surto de erliquiose eram machos, assim como nessa pesquisa, em que, 75% dos machos foram positivos na análise molecular para EMC. Esse fato pode estar associado ao comportamento dos cães machos, principalmente não castrados, serem semi-domiciliados e possuírem maiores chances de terem contato com carrapatos ao sair para rua à procura de fêmeas no cio ou até mesmo para marcar território (COSTA et al., 2007).

Nesse trabalho, a principal queixa dos tutores durante a anamnese foi apatia/hiporexia, em estudo realizado por PIETRO et al. (2016) foi descrito que um dos sinais clínicos da LVC é a hiporexia e emagrecimento concomitante, assim como BORIN et al. (2009) que em estudo retrospectivo no HVET-UFU observaram que 72,9% dos pacientes positivos na microscopia para *Ehrlichia* sp, apresentavam hiporexia e 89,2% apresentavam apatia. Em estudo conduzido por CIARAMELLA et al. (2005) foi também demonstrado que hiporexia/apatia pode correr em ambas as doenças. Portanto, essa informação não é suficiente para diferencia-las, podendo até confundir o médico veterinário durante o exame clínico.

Os principais sinais clínicos verificados nos cães pelos médicos veterinários residentes foram esplenomegalia, linfadenopatia, hipertermia. Esses achados são semelhantes aos encontrados por Carvalho (2015), que constatou em estudo de coinfeção de LVC e EMC os mesmos sinais clínicos em ambas as doenças, sendo ainda mais perceptíveis nos casos de coinfeção.

Outro achado muito relevante no presente estudo foi a alta incidência de alterações no hemograma desses animais, sendo a anemia e a trombocitopenia as mais visíveis em ambas doenças. Sendo observado que os pacientes coinfectados possuíam esses achados laboratoriais agravados, o que pode desencadear piores prognósticos, especialmente em áreas endêmicas para mais de uma enfermidade (MANNA et al., 2009).

Santos et al. (2009) estudaram cães com erliquiose e observaram que 46,7% apresentavam trombocitopenia, sendo também infectados com outros patógenos que não *E.*

canis, e ainda, constatou-se alta incidência (25.4%) com EMC, porém sem trombocitopenia . Num estudo realizado em Fortaleza - CE, foi verificado que 53,1% dos cães positivos para LVC apresentaram trombocitopenia (MEDEIROS et al., 2008), achado esse encontrado também nesse estudo, em que 63,6% dos pacientes com LVC apresentaram contagem total do número de plaquetas diminuído.

Segundo Macedo (2007) a erliquiose canina é a patologia mais frequente do HVET-UFU. Porém, o diagnóstico dessa doença no HVET-UFU, pode ser subestimado se utilizado para isso somente o exame parasitológico direto, uma vez que a exclusão desse não descarta a presença da doença. Contrário a isso, o diagnóstico também pode ser superestimado se utilizado para tal, somente os achados clínicos laboratoriais, e assim, confundido com outras DCTV como a própria leishmaniose

Desse modo, observamos que os achados clínicos/laboratoriais devem ser levados em consideração, mas o diagnóstico com base somente nesses fatores não é suficiente, já que os achados clínicos/laboratoriais são muito semelhantes, nada específicos e presentes nas duas enfermidades. Se o diagnóstico se baseasse somente nesses fatores, a vigilância epidemiológica e a adoção de medidas de controle para LVC seria dificultado (OLIVEIRA et al., 2009), e ainda, ocorreria o uso desnecessário e/ou indevido de antibióticos e outros medicamentos (MACIEIRA et al., 2005).

Diante da necessidade de exames com maior sensibilidade, o PCR adquiriu papel diagnóstico de grande relevância para diferentes doenças. Segundo MACEDO (2007), a nested-PCR é o método menos subjetivo para detecção de EMC. Para HARRUS et al. (2011), a detecção viável das doenças transmitidas por carrapatos é realizada por meio da análise molecular, pois essa técnica possibilita identificar o DNA do patógeno de forma rápida e sensível a partir de diferentes tipos de amostras biológicas. O que também ocorre para a LVC, em que amostras como as de sangue periférico, aspirado de medula óssea ou linfonodos, fragmentos de pele entre outros, permitem a detecção molecular rápida, sensível e específica de *Leishmania* sp, sendo uma técnica que tem adquirido eleição na rotina dos médicos veterinários (SILVA et al., 2017).

Assim, nesse trabalho utilizamos o exame molecular como método diagnóstico. Para isso recorremos à *primers* que amplificam uma região conservada do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* sp e *primers* altamente sensíveis e específicos que amplificam a região do minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp.

Em estudo realizado em Uberlândia sobre Leishmaniose visceral canina foi feita a reação de PCR para LVC de 25 animais suspeitos, pertencentes à Associação de Proteção aos animais (APA) que se localiza no Setor Oeste, mas recebe animais provenientes de várias regiões da cidade. Nesse trabalho, nenhum animal foi positivo para LVC. Esse dado, corrobora com os dados da prefeitura de Uberlândia em 2012, em que o Centro de Controle de Zoonoses divulgou uma prevalência de 0,26% de LVC em Uberlândia-MG. Diferentemente disso, na análise molecular realizada em nosso estudo para *Leishmania* sp foi encontrada positividade em 42,85% das amostras.

Contudo, estudos realizados demonstraram que a prevalência da doença na população canina varia de 20% a 40% no estado de São Paulo e é de 72,2% em Fortaleza (IKEDA et al., 2003; FREITAS et al., 2010). Além disso, Naves (2014) por meio de testes sorológicos e moleculares encontrou 31,58% de positividade para LVC em cães atendidos pelo programa de castração voluntária do Hospital Veterinário da UFU.

O aumento crescente de LVC em Uberlândia-MG, pode estar associado à baixa eficiência do programa de controle dessa zoonose (COSTA, 2011). Além disso, ressalta-se que o crescente processo de urbanização, e consequente desmatamento, resultantes da ação antrópica faz com que a leishmaniose deixe de ser uma doença tipicamente rural e passe a ser compatível com grandes centros urbanos, em que há adaptação do inseto vetor (BARÇANTE, 2015), como Uberlândia-MG.

Considerando que o principal método de transmissão é dado pela picada da fêmea do flebotomíneo, o controle dessa doença deveria se concentrar na prevenção do contato dos cães com os vetores, por meio de barreiras físicas como telas nos canis e barreiras químicas como o uso de repelentes e coleiras antiparasitárias. Além disso, se há falhas nessas medidas, o cão deve responder a um desafio imunológico por meio da prévia vacinação (RIBEIRO et al., 2018). Em geral, outra via de transmissão é por meio da transfusão de sangue, assim a triagem de produtos sanguíneos caninos pela PCR é recomendada em áreas altamente endêmicas para garantir a segurança desse recurso (QUISTON et al., 2000).

O percentual de positividade de EMC no HVT-UFU foi 55%, como o método de transmissão é pelo contato de cães com carrapatos, a prevenção dessa doença deve focar no controle frequente de carrapatos tanto no meio ambiente quanto nos animais por meio de coleiras e medicamentos anti-ectoparasitários. Além disso, é de suma importância o tratamento dos doentes para evitar novos ciclos de infecção da doença e fazer a triagem por

PCR de produtos sanguíneos antes de efetuar transfusões sanguíneas, já que esse método de transmissão também é descrito na literatura.

7. CONCLUSÕES

- As alterações clínicas/laboratoriais dessas doenças foram semelhantes nos animais analisados e não ofereceram dados para diagnóstico diferencial entre as doenças baseado somente nestas alterações;
- Obteve-se 55% de positividade para EMC e 42,85% para LVC, sendo que 27% dos animais em estudo estavam coinfectados para EMC e LVC;
- Ambas as doenças estão distribuídas por todas os Setores da cidade de Uberlândia;
- A maior ocorrência de EMC foi na zona leste de Uberlândia-MG, e de LVC foi na zona norte de Uberlândia-MG;
- A frequência tanto de EMC quanto de LVC foi maior em animais adultos; sendo que de EMC foi maior em animais do gênero masculino.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina em Uberlândia, Minas Gerais Brasil", protocolo nº 150/16, sob a responsabilidade de **Sydnei Magno da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 10 de fevereiro de 2017.

(We certify that the project entitled "Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina em Uberlândia, Minas Gerais Brasil", protocol 150/16, under the responsibility of **Sydnei Magno da Silva** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of February 10th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 01/04/2017 Término: 31/12/2018
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Canis familiaris (Cão Doméstico)
Número de animais	250
Peso / Idade	Variado / Acima de 6 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Cães de proprietários do projeto de castração voluntária do hospital veterinário da UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 14 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. Vector-borne Diseases, Surveillance, Prevention; **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126- 132 .2007.
- BORGES, G. L. Leishmaniose visceral canina no município de Uberlândia, Minas Gerais, outubro 2007 a fevereiro de 2008. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F. A.; Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014
- CARVALHO, R. M. A.; ESTUDO DA COINFECÇÃO *Leishmania infantum* E *Ehrlichia canis* EM CÃES NUMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2015. Tese de Doutorado - Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2015.
- CIARAMELLA, P.; PELAGALLI A.; CORTESE L.; PERO M.E.; CORONA M.; LOMBARDI P.; AVALLONE L.; PERSECHINO A.; Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs natural infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Journal**, v. 169, p.465–467, 2005.
- CORTESE, L., PELAGALLI A.; PIANTEDOSI D.; MASTELLONE V.; MANCO A.; LOMBARDI P.; CIARAMELLA P.; AVALLONE L.; Platelet Aggregation and Haemostatic Response in Dogs Naturally Coinfected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 546–548, 2006.
- COSTA, C. H.; How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public Health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p.232-42, 2011.

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

DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, p. 857-860, 2010.

DA SILVA, S.M. Avaliação de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurinol, no tratamento da leishmaniose visceral canina. 2011, 205f. Tese de Doutorado Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

DA SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M.; RIBEIRO, R.R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p.159-62, 2009.

DEGRAVE, W. F. O.; Campbell, D.; Bozza, M.L.U.; Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a min review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, p.463-469, 1994.

DUNAISKI, M.; Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira- Paraná: Cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba. 2006.

DEL OLMO, M.L., ALLER DE LA FUENTE R, VELAYOS JIMÉNEZ B, FERNÁNDEZ SALAZAR L, GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, J.M. Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v.101, n. 6, p. 439-440, 2009.

HARRUS, S.; KENNY M.; MIARA L.; AIZENBERG I.; WANER T.; SHAW S.; Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.4488–4490, 2004.

HUXSOLL, D. L.; AMYX, H. L.; HEMEL, I. E. PAUL, K.; NIMS, R. M, JR. W. G. G.; Laboratory Studies Tropical Canine Pancytopenia. **Experimental Parasitology** 31, 53-59, 1972.

LEGATZKI, K.; JORGE, P. S. Erliquiose canina – Uma doença emergente? **Nosso Clínico**, v. 5, n. 26, p. 12-19, 2002.

LIPOLDOVÁ, M, DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews/ Genetics**, c. 7, p. 294-305, 2006

MACEDO, E. A; BELETTI, M.E; Ultraestrutura de células parasitadas por *Ehrlichia* spp., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia-MG. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MACIEIRA, D.B.; MESSICK J.B.; CERQUEIRA A.D.E. M.; FREIRE I.M.; LINHARES G.F.; ALMEIDA N.K.; ALMOSNY N.R.; .Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, p. 44-48, 2005.

MANNA, L. REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E.;Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 76–78, 2009.

MEDEIROS, C.M.O.; MELO, A.G.C.; LIMA, A.K.F.; SILVA, I.N.G.; OLIVEIRA, L.C.; SILVA, M.C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v.8, n.1, p.43-50, 2008.

MORAIS, H.A.; ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados com *Ehrlichia* spp. **Revista Clínica Veterinária**, v.48, p. 28-30, 2004.

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

NAKAGHI A.C.H.; MACHADO R. Z.; FERRO J. A.; LABRUNA M. B.; CHRYSSAFIDI A. L.; ANDRÉ M. R.; BALDAN C. D.; Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 75-79, 2010.

- OLIVEIRA, T.M.; MINEO, T. W. ; BASON, M.; DAY, M.J.; MACHADO, R. Z.; IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 16-22, 2009.
- PIETRO, S. D., FRANCESCABOSCO, V. R C. CRINO, F. FRANCAVIGLIA, GIUDICE, E. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary World**, vol. 9, no. 6, pp. 633–637, 2016.
- SILVA, R. C., RICHINI-PEREIRA, V. B., M. KIKUTI, MARSON, P. M., LANGONI, H. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 23–30, 2017.
- RENÉ-MARTELLET, M.; LEBERT, I.; CHÊNE, J. ; MASSOT, R.; LEON, M. ;LEAL,A.; BADAVELLI, S; CHALVET-MONFRAY, K.; DUCROT, C.; ABRIAL, D.; CHABANNE, L.; HALOS, L.; Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasites & Vectors**. v. 6. p. 1-3, 2015. Disponível em <http://doi: 10.1186/s13071-014-0613-4>.
- RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; DA SILVA, M. E.; DOS SANTOS, C. C. P; FRÉZARD, F. J. G.; DA SILVA, S. M.; Canine Leshmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, 2018.
- READY, PAUL D. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 2014.
- RODGERS, M. R; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F; Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, p. 267-275, 1990.
- RUFINO, I. Bicho de estimação virou membro da família. Revista Exame. Uberlândia, janeiro de 2014. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/revista-exame-pme/edicoes/69/noticias/o-novo-membro-da-familia>> Acesso em: 15/09/2016.
- SANTARÉM, V. A. Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos, e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*. 2003. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2003.

SANTOS, J. P., SANTOS, M. P., SILVA, T. K., MUMDIM, E. D., CABRAL, A. D., CABRAL, D. D. Frequência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) no município de Uberlândia, MG. Brasil: avaliação por esfregaço sanguíneo. In XIII Congresso Brasileiro Parasitologia Veterinária & Simpósio Latino Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto.. **Annais**, Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. P 372

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

SYKES, J. E. Ehrlichioses, 2016. Disponível em < <https://veteriankey.com/ehrlichiosis/>> Acesso em 10/05/18

UNVER, A.; PEREZ, M.; OREELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y.;. Molecular and antigenic comparison of Ehrlichia canis isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal Clinical Microbiology**. v.39, n.8, p. 2788-2793, 2001.

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

VINASCO, J.; LI, O.; ALVARADO A; DIAZ, D.; HOYOS, L.; TABACHI, L.; SIRIGIREDDY, K.; FERGUSON, C.; MORO, MH.; Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2716–2719, 2007. doi:10.1128/JCM.01102-07.

WEISS, D.J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996–2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 955–961, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In **WHO Technical Report Series, Organization, W.H.**, ed. (Genebra, World Health Organization), p. 201.