



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* E DETECÇÃO MOLECULAR DA CO-INFECÇÃO DE HEMOPARASITOS EM CÃES**

WINNY GOMES DE OLIVEIRA SILVA

RECIFE-PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* E DETECÇÃO MOLECULAR DA CO-INFECÇÃO DE HEMOPARASITOS EM CÃES**

WINNY GOMES DE OLIVEIRA SILVA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Leucio Camara Alves

Co-orientador: Rafael Antônio do Nascimento Ramos

RECIFE-PE  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586a

Silva, Winny Gomes de Oliveira  
AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* E  
DETECÇÃO MOLECULAR DA CO-INFECÇÃO DE HEMOPARASITOS EM CÃES / Winny Gomes de  
Oliveira Silva. - 2020.  
67 f. : il.

Orientador: Leucio Camara Alves.  
Coorientador: Rafael Antonio Ramos do .  
Inclui referências e apêndice(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal Tropical, Recife, 2020.

1. Leishmaniose Visceral Canina . 2. Coinfecção. 3. Hepatozoon spp. 4. Babesia spp. 5. Diagnóstico  
direto. I. Alves, Leucio Camara, orient. II. , Rafael Antonio Ramos do, coorient. III. Título

---

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* E DETECÇÃO MOLECULAR DA CO-INFECÇÃO DE HEMOPARASITOS EM CÃES**

WINNY GOMES DE OLIVEIRA SILVA

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dr. Lêucio Câmara Alves  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

---

Dr. Rafael Antônio do Nascimento Ramos  
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

---

Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

---

Dr. Carlos Adriano de Santana Leal  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

*“Eu tenho um sonho de que um dia  
esta nação se levantará e viverá o verdadeiro significado de sua crença:  
Manter as raízes da verdade óbvia: de que todos os homens são criados iguais.*

*Eu tenho um sonho de que um dia  
nas colinas vermelhas da Geórgia os filhos dos descendentes de escravos  
e os filhos dos donos de escravos poderão se sentar junto à mesa da fraternidade.*

*Eu tenho um sonho de que um dia,  
até mesmo no estado do Mississippi, um estado deserto,  
que transpira com o calor da injustiça e da opressão,  
se transformará em um oásis de liberdade e justiça.*

*Eu tenho um sonho de que minhas quatro pequenas crianças  
viverão um dia em uma nação onde não serão julgadas pela cor da pele,  
mas pelo conteúdo de seu caráter.  
Eu tenho um sonho hoje!*

*Eu tenho um sonho de que um dia, no Alabama, com seus racistas cruéis,  
com seu governador de cujos lábios gotejam palavras de intervenção e negação;  
um dia lá mesmo no Alabama meninos negros e meninas negras  
poderão unir as mãos com meninos brancos e meninas brancas como irmãos e irmãs.  
Eu tenho um sonho hoje!*

*Eu tenho um sonho de que um dia todos os vales serão elevados,  
cada colina e montanha serão abaixados,  
os lugares ásperos serão aplainados e os lugares tortuosos serão endireitados e  
‘a glória do Senhor será revelada e todos os seres estarão unidos’”.*

Martin Luther King, 1963

*“Não temas, porque eu sou contigo;  
não te assombres, porque eu sou teu Deus;  
eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento  
com a destra da minha justiça.  
Eis que, envergonhados e confundidos  
serão todos os que se indignaram contra ti;  
tornar-se-ão em nada,  
e os que contenderem contigo, perecerão.  
Buscá-los-ás, porém não os acharás;  
os que pelejarem contigo, tornar-se-ão em nada,  
e como coisa que não é nada, os que guerrearem contigo.  
Porque eu, o Senhor teu Deus,  
te tomo pela tua mão direita;  
e te digo: Não temas, eu te ajudo.”*

Isaías 41:10-13

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela nova chance que recebo todo dia e por todas as conquistas.

A minha mãe e padrasto (Edilene e Eliel), que nunca mediram esforços para me apoiar em todas as minhas escolhas. Sem vocês não nada teria sido possível. Obrigada por tudo.

A Petrus, meu esposo e melhor amigo, que me acompanha diariamente, escutando todos meus problemas e apoiando. Obrigada por ser meu parceiro em tudo.

Aos meus amigos e colegas feitos no Laboratório de Doenças Parasitárias: Caio, Laís, Edson, Wagner, Jani, Cassia, Vanuza, Carol e “hepatozoon”, Rose, Eiji, especialmente Carlos Adriano, que fez minha PCR ser possível. Obrigada por todo apoio nessa jornada e nas próximas. Nossos momentos de descontração e troca de conhecimentos foram essenciais para minha formação. Força, pois, ainda tem muita luta pela frente.

A Talita e Jess, parceiras de luta e de café. Obrigada pelas conversas! Vocês foram essenciais para minha construção e evolução. Desejo toda felicidade e estabilidade financeira!

Aos meus amigos, que mesmo distantes, me apoiaram de alguma forma nessa caminhada: Hakunas (Lili, Lua e Rena), Grupo 15, Pri, Lucas, Fany, Karol, Raphael, Neto, Ana Paula (as duas da minha vida).

A Jaqueline Bianque (que me fez amar a parasitologia desde a graduação) e Rafael Ramos. Obrigada por tudo, mesmo que as vezes tenha sido apenas uma conversa, vocês abriram meus horizontes.

A Profa Maria Aparecida, que foi uma mãe para mim e todos do laboratório. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES .....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	13
1.INTRODUÇÃO .....	14
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 Leishmaniose Visceral .....	16
2.2 Leishmaniose Visceral Canina .....	16
2.2.1 Biologia parasitaria .....	17
2.2.2 Imunopatogenia .....	17
2.2.3 Sinais Clínicos .....	19
2.2.4 Diagnóstico .....	20
2.3. Principais hemoparasitos transmitidos por artrópodes em coinfeção com <i>L. infantum</i> .....	21
2.3.1. <i>Ehrlichia canis</i> .....	21
2.3.2. <i>Anaplasma platys</i> .....	22
2.3.3 <i>Babesia canis</i> .....	24
2.3.4 <i>Hepatozoon canis</i> .....	26
4.OBJETIVOS .....	28
4.1 Objetivo Geral .....	28
4.2 Objetivos Específicos .....	28
5.REFERÊNCIAS .....	29
CAPÍTULO I .....	44
1.INTRODUÇÃO .....	45
2.MATERIAL E MÉTODOS .....	46
2.1 Aspectos éticos .....	46
2.2 Triagem dos Animais .....	46
2.3 Diagnóstico Parasitológico .....	47
2.4 Métodos Estatísticos .....	47
3.RESULTADOS .....	47
4.DISSCUSSÃO .....	48
5. CONCLUSÃO .....	50
6. REFERÊNCIAS.....	50



CAPÍTULO II .....	55
ABSTRACT .....	56
1. INTRODUCTION .....	56
2. MATERIAL AND METHODS .....	57
2.1 Study area and ethical approval.....	57
2.2 Animal and sampling.....	58
2.3 Laboratory procedures .....	58
2.4 Data analysis.....	58
3.RESULTS.....	58
1. DISCUSSION .....	59
5. CONCLUSION .....	61
6. REFERENCES.....	61



**LISTA DE FIGURAS**

**CAPÍTULO II**

**EVALUATION OF *Hepatozoon canis* AND *Babesia vogeli* COINFECTION IN DOGS  
WITH NATURAL INFECTION OF *Leishmania infantum***

Figure 1. Romanowsky-type stained blood smear showing *Hepatozoon canis* gamonts (arrow) within a neutrophil x 100.....59

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I** **DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE *Leishmania infantum*: NA AUSÊNCIA DE** **MEDULA ÓSSEA, QUAL MELHOR AMOSTRA BIOLÓGICA?**

Tabela 1 – Presença ou ausência de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp em medula ossea, linfonodo, swabe conjuntival e pele de cães, através do método direto.....	47
---	----

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

® - Marca registrada

DMV – Departamento de Medicina Veterinária

DPP - *Dual Path Platform*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetraacético

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

INF- $\gamma$  - Interferon-gama

IL-12 - Interleucina 12

IL-2 - Interleucina 2

Km - Quilometros

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento

MO – Medula Óssea

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Th1 – Célula T auxiliar do tipo I

Th2 – Célula T auxiliar do tipo II

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral

UFPE - Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

## RESUMO

O diagnóstico da infecção por *L. infantum* continua sendo um desafio na clínica médica de pequenos animais, assim como a detecção da coinfeção com outros patógenos. Sendo assim este trabalho teve como objetivo avaliar o diagnóstico citológico da infecção por *Leishmania infantum* e detectar molecularmente a co-infecção de hemoparasitos em cães com infecção natural por *L. infantum*. Para tanto foram utilizadas amostras de medula óssea, linfonodo, pele e swabe conjuntival de 29 animais de raça, sexo e idade variadas com diagnóstico sorológico positivo para *L. infantum* para avaliação da melhor amostra biológica para o diagnóstico citológico, e amostras de sangue de 72 animais de raça, sexo e idade variadas com diagnóstico sorológico positivo para pesquisa da co-infecção. Os resultados evidenciaram que a citologia de linfonodo apresentou 61,1% (22/29) de positividade para formas amastigostas de *L. infantum*, seguidas da citologia esfoliativa da pele com 47,2% (17/29) e, por último, swabe conjuntival com 33,3% (12/29). Dos animais analisados na pesquisa direta para hematozoários apenas 1,39% (1/72) foram positivos, para *Hepatozoon canis*. Na reação da PCR foi observado amplificação do DNA de *H. canis* em 8,33% (6/72) e DNA de *Babesia vogeli* em 2,78% (2/72). Não houve coinfeção entre as hemoparasitoses no diagnóstico direto e molecular. Conclui-se que na ausência da biópsia medular, a citologia de linfonodo é a melhor amostra para o diagnóstico da LVC na rotina clínica, e que existe a presença de co-infecção entre *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Leishmania infantum* em Pernambuco.

Palavras chave: Leishmaniose Visceral Canina; Medicina canina; *Hepatozoon canis*; *Babesia vogeli*; Diagnóstico

## ABSTRACT

The diagnosis of infection by *Leishmania infantum* remains a challenge in the medical clinic of small animals, as a detection of coinfection with other pathogens. Thus, the work aimed to evaluate the cytological diagnosis of infection by *Leishmania infantum* and to detect a co-infection of hemoparasites in dogs with natural infection by *L. infantum*. For this, bone marrow, lymph node, skin and swabs set of 29 animals of different race, sex and age with positive serological diagnosis for *L. infantum* for evaluation of the best biological sample for clinical diagnosis, and blood samples from 72 animals of different race, sex and age with positive serological diagnosis for co-infection research. The results showed that lymph node cytology shows 61.1% (22/29) of positivity for amastigote forms of *L. infantum*, followed by exfoliative skin cytology with 47.2% (17/29) and, finally, swab conjunctival with 33.3% (12/29). The animals analyzed in the direct search for hematozoa only 1.39% (1/72) were positive, for *Hepatozoon canis*. The PCR reaction was observed to amplify the DNA of *H. canis* in 8.33% (6/72) and *B. vogeli* DNA detected in 2.78% (2/72). There was no co-infection between hemoparasitosis in the direct and molecular diagnosis. It concluded that the absence of spinal biopsy, a lymph node cytology is a better sample for diagnosis of CVL in the clinical routine, and that there is the presence of co-infection between *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis* and *Leishmania infantum* in Pernambuco.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis; Canine medicine; *Hepatozoon canis*; *Babesia vogeli*; Diagnosis

## 1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas e reemergentes distribuídas em 89 países com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano (WHO, 2016; MARCOVAL et al., 2017). A doença já foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina, sendo que 96,6% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (PAHO/WHO, 2013).

No Brasil a infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*, apresenta grande importância pelo seu potencial zoonótico, sua incidência e distribuição, além de formas graves associadas a coinfeções (MELO, 2004). O principal vetor no Brasil é a *Lutzomyia longipalpis* (ARIAS, 1996), e o cão é considerado o principal reservatório urbano (LANGONI et al., 2005).

Nos cães a leishmaniose visceral (LV) é uma doença imunomediada, sistêmica, crônica e até mesmo fatal, caracterizada por alterações clínicas muito variáveis, envolvendo diversos órgãos (CIARAMELLA e CORONA, 2003). Isto ocorre em consequência da multiplicidade de mecanismos patogênicos do protozoário, da diversidade de respostas imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e do longo período de incubação, que pode variar de alguns meses até vários anos (BANETH, 2006), estando muitas vezes associadas com a presença de outros patógenos (SCHAER et al., 1985; CIARAMELLA et al., 1997).

A coinfeção em cães com infecção natural por *L. infantum* é um achado comum na clínica de pequenos animais, uma vez que em função da presença de vetores hematófagos, principalmente ixodídeos, ocorre a transmissão de um ou mais patógenos simultaneamente (YISASCHAR-MEKUZAS, 2013).

No Brasil, os principais agentes que podem ser transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* são *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, (RAMOS et al 2010; LABRUNA E PEREIRA 2001; DANTAS-TORRES et al. 2004). A ocorrência de coinfeção em cães com LV, particularmente *B. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis* e *H. canis* já tem sido registrada em diversas regiões do Brasil (OLIVEIRA et al. 2008; PAULAN et al. 2013; GONÇALVES et al., 2014; MORGADO, 2016).

Mesmo que *L. infantum* e os hematozoários sejam transmitidos por vetores distintos, uma vez inoculados ocorre a disseminação atingindo a circulação e outros



órgãos, além que a maioria dos sinais clínicos são semelhantes, o que dificulta o diagnóstico clínico, principalmente em um animal coinfestado, que pode apresentar patogenia e sinais clínicos mais graves que um animal apenas com uma infecção (ANDRADE et al, 2014; CARVALHO, 2015).

A medula óssea, principalmente a esternal, embora tenha praticidade e rapidez, apresenta limitações, por ser uma técnica invasiva e traumática, que requer muitas vezes sedação, além de treinamento para realização da coleta (SUNDAR & RAI, 2002, RAMOS, 2012) e com o intuito de facilitar o diagnóstico da LVC na rotina clínica veterinária e garantir um resultado o a maior sensibilidade possível, objetivou-se com este trabalho avaliar qual melhor amostra a ser utilizada para pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania spp*, na ausência da citologia de medula óssea.

Apesar do registro da frequência e coinfecção de hemoparasitos em cães no estado de Pernambuco (RAMOS et al 2010), não foi realizado nenhum estudo sobre a coinfecção desses protozoários e bactérias em cães com LV. O trabalho tem como objetivo a avaliação do diagnóstico citológico da infecção por *leishmania infantum* e detecção molecular da co-infecção de hemoparasitos em cães.

## **2.REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Leishmaniose Visceral**

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por um protozoário pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, o gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que acomete os animais silvestres, domésticos e o homem em áreas rurais e urbanas (DANTAS-TORRES, 2007). A transmissão ocorre através da picada do vetor, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (ALVAR et al., 2004).

Hoje a LV está classificada entre as 10 doenças tropicais negligenciadas, com o surgimento de mais de 50.000 casos por ano, e incidência estimada de 500.000 novos casos por ano no mundo com 90% dos casos concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh, Etiópia, e Brasil segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017).

O cão é o principal reservatório urbano da doença no Brasil, fazendo parte da manutenção do ciclo epidemiológico da LV devido ao maior número de parasitos encontrados na pele íntegra, atração de flebotomíneos por compostos aldeídos e alcalinos na pele dos cães infectados (MAGALHÃES JUNIOR, 2015), e por manter um contato próximo entre humanos e outros cães, sendo assim considerado um elo importante na cadeia epidemiológica da doença (DEANE; DEANE, 1955; DI LORENZO et al., 2000; FEITOSA et al., 2000; HARHAY, 2011; LAURENTI et al., 2013).

### **2.2 Leishmaniose Visceral Canina**

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença dependente da resposta imune e que se apresenta geralmente como infecção crônica, (CIARAMELLA e CORONA, 2003), dependendo da interação entre agente e o hospedeiro (CIARAMELLA et al., 1997; ARESU et al. 2007; CORTESE et al., 2011).

Existem relatos que as raças Pastor Alemão, Boxer e Rottweiler apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, onde essas raças são usadas geralmente para caça ou como cães de guarda, ficando mais expostos aos vetores (MORENO e ALVAR, 2002, FRANÇA-SILVA et al., 2003; QUILEZ et al., 2012). Em contrapartida, os cães da raça Ibizan Hound possuem resistência, pois apresentam, principalmente, a resposta celular, debelando a infecção (SOLANO-GALLEGO, 2000).

Com relação a idade, não existe uma diferença significativa por se tratar de uma doença crônica que pode ter um tempo de incubação de três meses a sete anos (PINELLI et al., 1994; CABRAL et al., 1998; CARDOSO et al., 1998; MORENO; ALVAR, 2002). O sexo não se mostrou um fator importante (QUILEZ et al., 2012; PENAFORTE et al., 2013), embora segundo Oliveira (2010), os machos foram os que apresentaram maior positividade.

### **2.2.1 Biologia parasitaria**

No momento em que as fêmeas de flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo, (CASTRO, 1996) em um animal vertebrado infectado, são ingeridas as formas amastigotas de *Leishmania spp* junto com o sangue que ao chegar no intestino médio, sofrem divisão binária e modificam-se em promastigotas. Quando chegam na parede do intestino anterior, transforma-se em promastigotas metacíclicas, que é a forma infectante, que são inoculadas na pele de outro hospedeiro pela probóscide do mosquito durante um novo repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 2002).

No hospedeiro vertebrado as formas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos que podem eliminar a infecção ou dar continuidade dependendo da resposta imune. Tanto os promastigotas como neutrófilos infectados podem ser fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos, onde se diferenciam por divisão binária em amastigotas até que ocorra o rompimento da célula liberando essas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos assim continuando o ciclo (PALTRINIERI et al., 2010).

### **2.2.2 Imunopatogenia**

Existe cães que são capazes de resistir a infecção, seja eliminando o parasito ou restringindo, ficando na forma subclínica por longos períodos, os animais que desenvolvem a doenças após são considerados suscetíveis (GREENE, 2012). No entanto, a infecção subclínica não é necessariamente permanente, e fatores que causem imunossupressão ou coinfeções podem ocasionar o surgimento de sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O equilíbrio entre o Th1 e Th2 é crucial para o desenvolver ou não da doença (BANETH, 2008; PANARO, 2009). A resposta imune inata é a primeira linha de defesa

encontrada pela *Leishmania spp* ao entrar no hospedeiro (GREENE, 2012). Quando inoculadas as formas amastigotas podem ser fagocitadas por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos (GREEN et al., 1990), onde fica dentro de um vacúolo que posteriormente funde-se com lisossomo, que contém enzimas proteolíticas capazes de lisar as formas amastigotas, além de ativar elementos contra o parasito como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (GREEN et al., 1990). As formas amastigotas de *Leishmania spp* tem capacidade de se replicar no fagolisossomos dos macrófagos e impedir sua resposta através da produção de compostos, como lipofosfoglicanos, que inibem a maturação dos fagossomas (SACKS et al., 2012).

A ação dos neutrófilos pode, entretanto, colaborar para que as formas amastigotas de *Leishmania spp* não sofram lise pelo complemento, pois o óxido nítrico apresenta uma menor atividade oxidativa e inibição ou retardo da apoptose, o que facilita para que o neutrófilo seja fagocitado pelo macrófago (BRANDONISIO et al., 1996; GABRIEL, 2010). Os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígeno, estimulando o linfócito T CD4+ auxiliar tipo 1 (Th1) ou auxiliar tipo 2 (Th2) gerando então uma resposta favorável ou não para o desenvolver da infecção (LIEW e O'DONNELL, 1993).

As células dendríticas quando infectadas produzem IL-12 que estimula as células T CD4 + para resposta Th1 e produção de IFN- $\gamma$  pelas células natural killer, levando à ativação dos macrófagos infectados como também para a diferenciação de mais Th1, gerando ação pró inflamatória, produção de citocinas, fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina 2 (IL-2), estimulando outras células e o óxido nítrico, responsável pela morte intracelular do parasito, podendo eliminar a infecção (IKEDA et al., 2003).

Quando as células Th2 são ativadas, há produção das interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 e elevada produção de anticorpo pela proliferação de células B, e cadeia anti-inflamatória, desativando o macrófago infectado e regulando negativamente a produção de óxido nítrico que leva a replicação parasitária desregulada, promovendo a formação de imunocomplexos que são depositados em vários órgãos, permitindo o

desenvolvimento da doença (MAKNI et al., 1989; PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2006).

Uma falha na produção de IL-12 funcional por células dendríticas, da resposta pró inflamatória ou na produção de óxido nítrico, leva à expansão progressiva de células Th2, aumento da atividade da arginase em macrófagos e proliferação de parasitos (GORAK et al., 1998; DESCHACHT, 2012).

### **2.2.3 Sinais Clínicos**

Após a infecção, a evolução clínica pode-se fazer presente em meses ou até mesmo anos, que através de todos os fatores já citados podem levar até a cura espontânea, sendo assim os animais podem se apresentar assintomáticos, ou sintomáticos (FERRER, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

As dermatopatias ocorrem na maioria dos casos de LVC, ocorrendo de 80% a 90% dos casos (SLAPPENDEL, 1988; KOUTINAS, 1999), particularmente lesões esfoliativas, papulares, nodulares, ulcerativas e alopecia local ou generalizada, além de onicogribose, são as mais predominantes na doença, sendo as úlceras geralmente localizadas nas orelhas, focinho, cauda e articulações (ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2011, SOLANO-GALLEGO et al., 2017; NOLI e AUXILIA, 2005; PALTRINIERI et al., 2016). Os nódulos e pápulas são originados nos locais de inoculação das formas promastigotas pelos flebótomos (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Consequentemente é o local com maior densidade formas

A linfadenomegalia também pode estar presente junto com as dermatopatias, apresentando-se com aspecto inicial exsudativo (LUVIZOTTO, 2006).

Nefropatias ocorrem principalmente pela ação de anticorpo anti-histona, deposição de imunocomplexos e presença do parasito nas membranas glomerulares e resposta imunocelular eventualmente culminando em glomerulonefrite (COSTA et al., 2000; ARESU et al., 2013). Apresenta uma progressão de proteinúria assintomática para síndrome nefrótica e / ou doença renal terminal (síndrome urêmica), apontado como a principal causa de óbitos em cães com LV (FERRER, 2002; MIRÓ et al., 2008).

As oftalmopatias também podem ser observadas, como ceratoconjuntivite e uveíte que são decorrentes da resposta inflamatória pela presença do parasito, gerado

pelo infiltrado linfoplasmocitário, granulomatoso e deposição de imunocomplexos (FERRER, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os animais apresentam também problemas articulares como poliartrite, polimiosite, paresia dos membros posteriores devido a deposição de imunocomplexos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Epitaxes uni ou bilateral, são frequentemente associados a lesões inflamatórias e/ou ulcerativas das mucosas nasais, mas também podem estar ligados à distúrbios de hemostasia, como trombocitopenia (FERRER, 1992). Atrofia muscular, emese e diarreias associadas a colite e hepatite, polidipsia não são achados muito frequentes, mas também podem estar presentes (CIARAMELLA, 1997; KOUTINAS, 1999; BLAVIER, 2001)

#### **2.2.4 Diagnóstico**

Na ausência de um diagnóstico que possua 100% de especificidade e sensibilidade (MOREIRA JR, et al., 2003) a LVC precisa, além dos achados clínicos, um conjunto de exames laboratoriais para que se chegue a um diagnóstico preciso e correto (ALVAR et al., 2004; MAIA e CAMPINO, 2012). O diagnóstico direto das formas amastigotas é a técnica mais utilizada nas clínicas veterinárias, embora os métodos mais sensíveis sejam sorologia e PCR (SOLANO – GALLEGO, 2009; PENNISI, 2015).

O exame direto é um dos exames mais utilizados no diagnóstico devido ao baixo custo, sendo considerado o padrão ouro. O material pode ser obtido através da punção da medula óssea, linfonodo ou citologia esfoliativa da pele íntegra ou lesionada (GENARO, 1993; SILVA, 2007; GREENE, 2012). Apesar de ter uma especificidade de 100%, a sensibilidade depende de diferentes fatores, podem levar a diferença entre positividade, como a carga parasitária, a espécie de *Leishmania* envolvida, o tempo de evolução da lesão, qualidade do material coletado, a hemodiluição no momento da coleta de amostras da Medula Óssea, o tipo de corante utilizado, o tempo e o número de campos microscópicos examinados e a experiência do profissional que realiza o exame (RAMIREZ et al., 2000; CASTILLO & ROJAS, 1997; FARIA; ANDRADE, 2012).

O segundo método mais utilizado é a sorologia, através da detecção de anticorpos IgG anti *Leishmania sp.* No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o diagnóstico da infecção pelo Dual Path Platform (DPP) – BioManguinhos/Fundação Oswaldo Cruz® como triagem e o ELISA como teste confirmatório (GRIMALDI et al., 2012; BRASIL, 2014), mas a interpretação exige experiência do Médico Veterinário, já que pode ocorrer reações cruzadas, gerando um falso positivo (RIBEIRO, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BARROS et al., 2012).

O diagnóstico molecular através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é o que chega o mais próximo de 100% tanto na sensibilidade como especificidade, que pode variar de acordo com a amostra utilizada e sua respectiva carga parasitária, podendo ser usado medula óssea, baço, linfonodos, pele, suabe conjuntiva e sangue. (MAIA e CAMPINO, 2008; FERREIRA, 2013; SILVEIRA et al., 2018).

### **2.3. Principais hemoparasitos transmitidos por artrópodes em coinfeção com *L. infantum***

#### **2.3.1. *Ehrlichia canis***

A *Ehrlichia canis* foi descrita inicialmente por Donatien e Lestoquard, (1935) os quais observaram no esfregaço sanguíneo de um cão da raça Pastor Alemão infestado por *Rhipicephalus sanguineus* a presença de pequenos organismos semelhantes a *Rickettsia* no interior de monócitos, que foram nomeados *Rickettsia canis*. Posteriormente no ano de 1945, Moshkovshi renomeou a para *Ehrlichia canis* por conter caracteres morfológicos e biológicos compatíveis com o gênero *Ehrlichia* (RISTIC et al., 1984; McDADE, 1990). Apenas na década de 60 é que a doença ganhou destaque quando acometeu 300 cães do exército americano na guerra do Vietnã (HUXSOLL et al., 1970; COSTA, 2018).

A transmissão desta bactéria aos cães tem sido realizada primariamente pelo *R. sanguineus* em regiões urbanas (BREMER et al., 2005) e *Amblyomma cajennense* em áreas rurais (COSTA JR et al., 2007), além de *Dermacentor variabilis* em condições experimentais (JOHNSON et al., 1998).

A infecção depende de fatores climáticos, influenciada principalmente pela distribuição do vetor, comportamento animal e habitat (DAGNONE et al., 2001). Por outro lado, a suscetibilidade racial, notadamente animais de raça Doberman, Pincher

e Pastor Alemão (TILLEY; SMITH; FRANCIS, 2003), idade do animal, alimentação e coinfeções também influenciam na severidade da doença (SILVA, 2001; SILVA et al., 2010).

Após a infecção, o período de incubação dura de oito a 20 dias. Os animais apresentam sintomatologias que podem evoluir de aguda, subclínica, crônica ou assintomáticas (NEER, 1998). A trombocitopenia é uma das principais alterações hematológicas encontradas e vários mecanismos estão envolvidos na sua patogênese, que incluem aumento do consumo de plaquetas e diminuição da meia-vida plaquetária, provavelmente como resultado do sequestro esplênico e destruição imuno mediada ocasionada pela ação de anticorpos antiplaquetários (GRENEE, 2006).

A fase aguda tem duração entre duas a quatro semanas e os cães apresentam sinais clínicos como anorexia, apatia, vômitos, febre, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, perda de peso, petéquias, epistaxe e uveíte (AGUIAR et al., 2007; BORIN et al., 2009). A maioria dos cães se recupera da fase aguda com tratamento adequado, porém os não tratados ou aqueles tratados inadequadamente podem se recuperar clinicamente, mas depois entrar na fase subclínica, onde apenas apresentam trombocitopenia (GRENEE, 2006).

Na fase subclínica, após seis a nove semanas, o peso dos animais normaliza e a febre cessa (UENO et al., 2009), e estão clinicamente saudáveis, mas não eliminam totalmente a bactéria, permanecendo como potenciais portadores persistentes por anos. *E. canis* é encontrada em maior quantidade no baço, sendo este o último órgão a acomodar o parasito antes da sua eliminação (BREITSCHWERDT, 2004; GREENE, 2006).

Já na fase crônica o animal apresenta sinais clínicos semelhantes à aguda, porém de forma mais grave, com supressão medular e sangramentos por mucosa e conjuntivas (DAGNONE et al., 2001). Os achados hematológicos são anemia arregenerativa, leucopenia e trombocitopenia intensas (MOREIRA et al., 2003; BORIN et al., 2009), levando à letalidade pela intensa hemorragia ou por infecções secundárias (GREENE, 2006).

### **2.3.2. *Anaplasma platys***



O primeiro relato da *A. platys* foi descrito por Harvey em 1978, na Florida, após observar a presença de estruturas basofílicas em plaquetas de animais trombocitopênicos. A *A. platys* já foi descrita na Grécia, França, Itália, Israel, China, Japão, Tailândia, Estados Unidos, Venezuela (BROWN et al., 2001) e em várias regiões do Brasil (MACHADO, 2004), sendo *R. sanguineus* o provável vetor conhecido (SIMPSON et al., 1991; INOKUMA et al., 2000; SOUZA et al., 2004.; RAMOS et al., 2014).

Pela capacidade de sobreviver em ambientes diversificados e por longo período sem se alimentar, além de uma ampla distribuição geográfica, os carrapatos são um dos ectoparasitos mais importantes em termos de transmissão de doenças (DANTAS-TORRES, 2008).

A transmissão natural da *A. platys* ocorre quando um carrapato infectado se alimenta em um animal susceptível transmitindo os microrganismos por meio das secreções salivares durante o momento da picada (PREZIOSI; COHN, 2002). A transmissão também pode ocorrer durante a transfusão sanguínea (GASPARNI et al., 2012). A célula de predileção é a plaqueta, mas já foi demonstrado que a bactéria pode infectar promegacariócitos e megacariócitos, células precursoras de plaquetas provenientes da medula óssea (TOMMASI et al., 2014).

Depois de um período de oito a 15 dias após a inoculação é possível detectar um grande número de plaquetas parasitadas em estiraços sanguíneos, e logo em seguida o número de plaquetas diminui, pois são removidas da circulação por macrófagos no fígado, baço, medula e mecanismos imunomediados levando a episódios trombocitopênicos cíclicos, tornando difícil o diagnóstico através de exame direto. Após o desaparecimento dos microrganismos, a plaquetometria volta ao normal em três ou quatro dias (NEER E HARRUS, 2006; EDDLESTONE et al., 2007).

A infecção pode se manifestar de forma aguda, subclínica e crônica. Na forma aguda os animais apresentam vômito, diarreia, anorexia, perda de peso, letargia e depressão (MACHADO E SILVA, 2010). No hemograma é possível observar trombocitopenia cíclica em intervalos de sete a 14 dias que após um período tendem a retornar a valores normais após três a quatro dias (ALMOSNY et al., 2002).

A fase subclínica é geralmente assintomática, podendo durar meses ou anos (BREITSCHWERDT, 1995). É encontrado alteração na função plaquetária, hiperplasia megacariocítica e dificilmente as inclusões são observadas no estiraço

sanguíneo, porém os valores do eritrograma e do leucograma permanecem normais (ALMOSNY et al., 2002)

Na fase crônica é possível observar fraqueza, depressão, anorexia, perda crônica de peso, mucosas pálidas, febre, além de tendências hemorrágicas, linfadenomegalia, esplenomegalia, sinais oculares e alterações secundárias como pneumonia, glomerulonefrite e artrite (GREENE, 1995). O processo cíclico das trombocitopenias tende a reduzir com a cronificação da doença, resultando em esporádicas aparições do parasito e trombocitopenias moderadas (HIBLER et al., 1986; WOODY E HOSKINS, 1991).

### **2.3.3 *Babesia canis***

*Babesia* é um protozoário da Ordem Piroplasmida e Família Babesiidae que compreende duas espécies: *Babesia gibsoni* e *Babesia canis* (SILVA et al., 2013).

*Babesia canis* foi descrita pela primeira vez em 1895, por Piana e Galli-Valerio, na Itália e *B. gibsoni* foi descrita pela primeira vez na Índia, por Patton (1910) (BARREIRA et al., 2005; O'DWYER et al., 1997). Logo, a partir das primeiras descrições, *B. canis* foi observada na Europa, África, Ásia, Índia, América do Norte e América do Sul (ALMOSNY, 2002).

A partir de estudos moleculares e genéticos ela também pode ser subdividida em três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* parasitando os eritrócitos (CARRET et al., 1999). Sendo assim *B. canis canis* tem como vetor o carrapato *Dermacentor reticulatus*, na Europa; *B. canis rossi* é transmitida pelo carrapato *Haemophysalis leachi*, comum na África do Sul e *B. canis vogeli* é transmitida pelo *R. sanguineus* que também pode ocorrer entre eles de forma transtadial e transovariana (CHAUVIN et al., 2009).

No Brasil o primeiro relato de *B. canis vogeli* ocorreu em 2005, diagnosticado através de PCR em cães naturalmente infectados, sendo então a espécie mais comum (PASSOS et al., 2005; RAMOS, 2010;), com relatos também de *B. canis rossi* (VASCONCELOS, 2010) e *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006).

A babesiose canina também tem sido reportada em vários estados do Brasil, como o Paraná (TRAPP et al., 2006), Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2006), Bahia (UNGAR DE SÁ et al., 2007), Goiás (DUARTE et al., 2008), Distrito Federal (VASCONCELOS et al., 2010), Minas Gerais (BASTOS et al., 2004), São Paulo

(DELL'PORTO et al., 1993), Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2004), e Rio Grande do Sul (BRACCINI et al., 1992).

A patogenia da babesiose está relacionada com a ação hemolítica, intra e extravascular, variando com a espécie de *Babesia*, cepa, dose infectante, imunidade e idade do hospedeiro vertebrado (ALMOSNY, 2002). Eritrócitos infectados incorporam antígenos do parasito na sua superfície induzindo os anticorpos a fazerem a opsonização dessas hemácias que são removidas da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear (GREENE, 2006).

Os cães podem ser acometidos por infecções superagudas, agudas, crônicas, subclínicas e complicadas (NELSON; COUTO, 1998). A forma superaguda da doença é mais observada em cães jovens e os sinais clínicos são anemia intensa, hemoglobinúria, icterícia, temperatura baixa, podendo ocorrer, mesmo que raramente, babesiose cerebral, choque, coma ou morte a menos de um dia de anorexia e letargia, podendo, ainda, ser observada hematúria (TABOADA E MERCHANT, 1997).

A forma aguda da doença é caracterizada por anorexia, letargia, vômitos e febre, podendo ainda ser observado hematúria, icterícia, linfadenopatia generalizada e edema periorbitário. A anemia hemolítica imunomediada é importante para o diagnóstico diferencial da Babesiose (TABOADA E MERCHANT, 1997).

Quando a doença se apresenta na forma crônica ocorre febre intermitente, anorexia, emaciação, fraqueza, esplenomegalia e raramente hemoglobinúria e icterícia. Pode haver acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada e pancreatite aguda (ALMOSNY, 2002).

Já na subclínica os animais apresentam sinais brandos como apatia e febre, recuperam-se rapidamente tornando-se portadores do parasito. Entretanto, animais portadores podem adoecer quando são submetidos a estresse intenso como doenças concomitantes ou terapia com corticoides (ALMOSNY, 2002).

Na fase complicada, além dos vários sinais clínicos já referenciados é possível encontrar sinais como estomatite ulcerativa, convulsões, astenia, ataxia, edema, ascite, artrite e evidência de doença respiratória (NELSON; COUTO, 1998). A coinfeção com outros patógenos, como *E. canis* e *A. platys*, pode ser o motivo da diversidade de sinais clínicos observados nas diversas manifestações da babesiose (TABOADA E MERCHANT, 1997).

A gravidade dos sinais clínicos varia com a espécie ou subespécie, com a idade, resposta imune do hospedeiro e presença de infecções concomitantes (SCHETTERS et al., 1997; BOOZER E MACINTIRE, 2003). *B. canis rossi* causa, frequentemente, infecção fatal; *B. canis vogeli* causa infecção moderada ou subclínica e *B. canis canis* apresenta patogenicidade variando entre *B. canis rossi* e *B. canis vogeli* (UILENBERG et al., 1998).

O achado hematológico mais consistente é anemia hemolítica, do tipo regenerativa, mas a anemia normocítica normocrômica também é encontrada nos primeiros dias da infecção (GREENE, 2006). Também é observada trombocitopenia, leucocitose, neutrofilia, neutropenia, linfocitose e eosinofilia (GREENE, 2006).

#### **2.3.4 Hepatozoon canis**

Sendo classificado a princípio como *Leucocytozoon canis* por BENTLEY (1905) e JAMES (1905), o gênero *Hepatozoon*, que foi descoberto na Índia, teve seu nome mudado para *H. canis* por Wenyon (1940). Atualmente são conhecidas duas espécies que acometem os cães, a *H. americanum* que foi descrito nos Estados Unidos (VINCENT-JOHNSON et al., 1997; BANETH e SHKAP, 2003), e a *H. canis* que é encontrada na Europa, África, Ásia, e América do Sul (BANETH et al., 2003).

No Brasil a infecção por *H. canis* foi relatada pela primeira vez no Rio de Janeiro (MASSARD, 1979) e hoje em dia já foi descrita em vários estados como São Paulo (RUBINI et al., 2008), Espírito Santo (SPOLIDORIO et al. 2009) e Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2010; RAMOS et al., 2010). Os diferentes trabalhos publicados no Brasil revelaram que *H. canis* está presente em todas as regiões, sendo a sua prevalência muito variável, dependendo da região, da origem dos animais, ou seja, se os cães são de áreas rurais ou urbanas, e da metodologia de diagnóstico utilizada, se esfregaços de sangue ou PCR (OLIVEIRA, 2018).

O ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* era o único responsável pela transmissão do protozoário *Hepatozoon canis* (CRAIG et al., 1978); mas Murata e os seus colaboradores (1995) apontaram *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis flavas* como potenciais vetores. No Texas, Estados Unidos, o *Hepatozoon americanum* é transmitido pelo vetor *Amblyomma maculatum* (BANETH et al., 2000; CRAIG et al., 1978; MATHEW et al., 1998).

Já no Brasil o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) é o principal vetor, além do *Amblyomma ovale* (FORLANO, 2005) e do *R. (Boophilus) microphilus* (DE MIRANDA et al. 2011), que já foram sugeridos como potenciais vetores quando são ingeridos pelo animal.

Cães com idade inferior a um ano são mais predispostos ao desenvolvimento da hepatozoonose em razão da imaturidade do sistema imunológico (CHHABRA et al. 2013; GOMES et al., 2010), mas até o momento acredita-se que não exista predisposição racial e sexual (EL-DAKHLY et al., 2013, GOMES et al., 2010).

No Brasil a maioria dos cães infectados apresenta sinais subclínicos por *H. canis*, encontrado com bastante frequência em associação simultânea com outros patógenos (O'DWYER, 2011; BORGEST, 2015). De acordo com O'Dwyer e colaboradores (2001), a patogenicidade e manifestações clínicas da infecção por *H. canis* varia de acordo com a idade do hospedeiro, grau de infecção e coinfeccções. Apesar disso, os sinais clínicos mais observados são febres, depressão, letargia, corrimento ocular, linfadenomegalia, perda de peso, palidez das mucosas e anorexia (BANETH et al., 1995; MYLONAKIS et al., 2005; PALUDO et al., 2003).

## **4.OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar o diagnóstico citológico em diversas amostras biológica para detecção de *Leishmania infantum* e co-infecção por hemoparasitos

### **4.2Objetivos Específicos**

1. Avaliar a sensibilidade citológica de amostras biológicas para diagnóstico de *Leishmania sp* na ausência de medula óssea;
2. Determinar a frequência de coinfeção dos hematozoários em cães com infecção natural por *L. infantum* no estado de Pernambuco;
3. Realizar a detecção molecular dos hemoparasitos encontrados em cães com infecção natural por *L. infantum* no estado de Pernambuco.

## 5.REFERÊNCIAS

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

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, Javier. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57., p. 2-88, 2004

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

ARESU L, VALENZA F, FERROGLIO E, PREGEL P, USLENGHI F, TARDUCCI A, ZANATTA R. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 1, p. 569-572. 2007.

ARESU L, BENALI S, FERRO S. Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from Leishmaniasis positive dogs. **Veterinary Pathology**. v.50, p. 753–760, 2013.

ARIAS, Jorge R.; MONTEIRO, Pedro S.; ZICKER, Fabio. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 145, 1996.

BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. **Leishmaniasis**. In: **Greene CE, ed. Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4 ed., MO: Elsevier/Saunders; St Louis, 2012.

BANETH G, KOUTINAS AF, SOLANO-GALLEGO L, et al. Canine leishmaniasis: new concepts and insights on an expanding zoonosis. Part one. **Trends Parasitology**, v. 24, p.324–330, 2008

BANETH, G. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4 ed, p. 685–698, Saunders/Elsevier. 2006

BANETH, G.; SHAW S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.315-324, 2002.

BANETH, Gad; SHKAP, Varda. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 379-381, 2003.

Barreira JD, Rossi MID, Pires FA, Silva GVOD, Massard CL. Dinâmica de infecção de *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1983) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Ciência Rural**. v.35, n.5, p. 1131-1135, 2005.

BARROS JHS, ALMEIDA, ABPF, FIGUEIREDO FB, SOUSA VRF, FAGUNDES A, PINTO AGDS MADEIRA, MDF. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine

leishmaniasis control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.419-423, 2012.

BLAVIER A, KEROACK S, DENEROLLE P, et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal.**; p. 162:108–120, 2001.

BOOZER AL, MACINTIRE DK. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**. v. 33, p. 885-904, 2003.

BORGES, CEF, DE SOUSA FIGUEIRÓ, B, GOMIDE CR, ALVARENGA TM P, DE MESQUITA NETO FD. Alterações hematológicas em cães infectados pelo *Hepatozoon canis*. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, p. 6-11, 2015.

BORIN S, CRIVELENTI LZ, FERREIRA FA. 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.

BRACCINI GL, CHAPLIN EL, STOBBE NS, ARAUJO FAP, SANTOS NR. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 1986-1990. *In: Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, v. 20, p. 134-149, 1992.

BRANDONISIO O, PANUNZIO M, FALIERO .M, CECI L, FASANELLA A., PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in Leishmania infantum-infected dogs. **Veterinary immunology and immunopathology.**, v. 53: p. 95-103,1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BREITSCHWERDT EB. The rickettsioses. *In: ETTINGER SJ, FELDMAN EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, p. 376-383, 1995.

BREITSCHWERDT, EB. Riquetsioses. **ETTINGER, SJ; FELDMAN, EC Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 423-427, 2004.

BREITSCHWERDT, EB. High Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Dogs from an Indian Reservation in Northeastern Arizona. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. Março; v. 10(2), p.117-23, 2010.

BROWN, G. K, MARTIN, A. R, ROBERTS, T. K, AITKEN, RJ. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Australian Veterinary Journal.**, v. 79, n. 8 p. 554-558, August 2001.



CABRAL, M., GRADY, J., GOMES, S., SOUSA, J., THOMPSON, H. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173-180, 1998.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

CARDOSO, L., NETO, F., SOUSA, J.C., RODRIGUES, M., CABRAL, M. Use of leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 79(3), p. 213-220, 1998.

CARRET, C., WALAS, F., CARCY, B., GRANDE, N., PRÉCIGOUT, É., MOUBRI, K., e GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-301, 1999.

CARVALHO, R. M. A. **Estudo da coinfeção *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* em cães numa área endêmica para leishmaniose visceral canina**. 2015, 79p, Tese de doutorado, 79p. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2015

CIARAMELLA, P., PELAGALLI, A., CORTESE, L., PERO, M. E., CORONA, M., LOMBARDI, P., PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 169, n. 3, p. 465, 2005

CIARAMELLA, P; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on continuing education for the practising veterinarian-north american edition-**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

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

CHHABRA, SUSHMA; UPPAL, SANJEEV KUMAR; SINGLA, LACHHMAN DAS. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 483-486, 2013.

CHAUVIN, A., MOREAU, E., BONNET, S., PLANTARD, O., & MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary research**, v. 40, n. 2, p. 1-18, 2009.

CORTESE, L., TERRAZZANO, G., PIANTEDOSI, D., SICA, M., PRISCO, M., RUGGIERO, G., CIARAMELLA, P. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 118-121, 2011.

CORTESE, L., PELAGALLI, A., PIANTEDOSI, D., MASTELLONE, V., MANCO, A., LOMBARDI, P., & AVALLONE, L. Platelet Aggregation and Haemostatic Response in Dogs Naturally Co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, n. 10, p. 546-548, 2006.

COSTA, C.H.N., GOMES, R.B.B., SILVA, M.R.B., GARCEZ, L.M., RAMOS, P.K.S., SANTOS, R.S., SHAW, J.J., DAVID, J.R., MIGUIRE, J.H. COMPETENCE of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 3, p. 997-1000, 2000.

CRAIG, T. M., SMALLWOOD, J. E., KNAUER, K. W., MCGRATH, J. P. Hepatozoon *canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematologic findings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 8, p. 967-972, 1978.

DA COSTA, RENATA LINS. **Caracterização Molecular De *Ehrlichia Canis* (Donatien E Lestoquard, 1935) Em Cães Do Estado Do Rio De Janeiro**. p. 112-112. 2018.

DAGNONE AS, DE MORAIS HSA, VIDOTTO O. Animal and human Ehrlichiosis/Erlíquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, 2001.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, Keele University, v. 1, n. 1, p. 25-42, 2008.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES F, FIGUEREDO L. A, FAUSTINO M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004.

DE MIRANDA, R. L, DE CASTRO, J. R, OLEGÁRIO, M. M. M., BELETTI, M. E., MUNDIM, A. V., O'DWYER, L. H., BANETH, G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 392-396, 2011.

DELL' PORTO, A.M.R.; OLIVEIRA, AND O. MIGUEL. *Babesia canis* in stray dogs of the city of São Paulo. Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescent antibody test. *In: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2 (1): 37-40, 1993.

DESCHACHT M, VANA T, HENDRICKX S, BULT H, MAES L, Cos P. Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. **Parasitology**, v.139(11), p. 1429–1437, 2012.

DI LORENZO C, PROIETTI FA, ASSUNÇÃO RM. A urbanização da leishmaniose visceral no Brasil – uma breve revisão. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 33(1). p. 316-7, 2000.

DINIZ, P.P.V.P.; BEALL, M.J.; KOMARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.A.; CYR, K.E.; KOTERSKI, J.F.; ROBBINS, R.J.; LALO, P.G.; HEGARTY, B.C.; High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in northeastern Arizona. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 2, p. 117-123, 2010.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DUARTE, S. C.; LOULY, C. C. B.; NETO, O. J. S.; ROMANOWSKI, T. N. A.; JUNIOR, R. S.; LINHARES, G. F. C. Diagnóstico parasitológico e molecular da babesiose canina na cidade de Goiânia – GO. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-236, 2008.

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

EDDLESTONE, S.M.; GAUNT, S.D.; NEER, T.M.; BOUDREAUX, C.M.; GILL, A.; HASCHKE, A.; CORSTVET, R.E. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 205–210, 2007.

EL-DAKHLY, K. M., GOTO, M., NOISHIKI, K., EL-NAHASS, E. S., HIRATA, A., SAKAI, H., & YANAI, T. Prevalence and diversity of Hepatozoon canis in naturally infected dogs in Japanese islands and peninsulas. **Parasitology research**, v. 112, n. 9, p. 3267-3274, 2013.

EWING SA. Methods of reproduction of Babesia canis in erythrocytes. **American journal of veterinary research**. v. 26(112), p. 727-733, 1965.

FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R., & PERRI, S. H. V. CLINICAL aspects of dogs with visceral leishmaniasis from Araçatuba-São Paulo State (Brazil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FELICIANGELI, M. D., RODRIGUEZ, N., DE GUGLIELMO, Z., & RODRIGUEZ, A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. **Vectors and parasites**, v.6, p. 113–120, 1999.

FERRER L. The pathology of canine leishmaniasis. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Seville, Spain, p.21-24, 2002.

FERRER L. Leishmaniasis. *In*: Kirk RW, Bonagura JD, eds. Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia, PA: **WB Saunders**; v. 14, p. 266–270, 1992.

FERREIRA, L.F. O fenômeno parasitismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 261- 277, 1973.

FERREIRA, R. F. ; CERQUEIRA, A. M. F. ; PEREIRA, A. M. ; VELHO, P. B. ; AZEVEDO, R. ; RODRIGUES, I. L. ; ALMOSNY, N. R. P. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, vol. 17, núm. 1, setembro, p. 5-8, 2008.

FORLANO, M., SCOFIELD, A., ELISEI, C., FERNANDES, K. R., EWING, S. A., & MASSARD, C. L. Diagnosis of Hepatozoon spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 1-7, 2005.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Monte Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, 2003

GABRIEL C, MCMASTER WR, GIRARD D, DESCOTEAUX A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **Journal of Immunology**. v.185(7), p. 4319–4327, 2010

GASPARNI, M.R., COELHO, A. L. M., JOJIMA, F. S., VIDOTTO, M. C., VIDOTTO, O. Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. vol.21, n.4, p.379-385, 2012

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 220f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GOMES, P. V., MUNDIM, M. J. S., MUNDIM, A. V., DE ÁVILA, D. F., GUIMARÃES, E. C., & CURY, M. C. Occurrence of Hepatozoon sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 155-161, 2010.

GONÇALVES LR, FILGUEIRA KD, AHID SMM, PEREIRA JS, VALE AM, MACHADO RZ, et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**; v. 23(3), p. 407- 412, 2014

GORAK PM, ENGWERDA CR, KAYE PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**. v. 28(2), p. 687–695, 1998.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4. ed. [s.l.] Elsevier/Saunders, 2012.

GREENE, C E. Infectious diseases of the dog and cat. **WB Saunders\Elsevier Science**, 2006.

GREEN, S.J., MELTZER, M.S., HIBBS JR., J.B., NACY, C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990.

GRIMALDI JR, G., TEVA, A., FERREIRA, A. L., DOS SANTOS, C. B., PINTO, I. D. S., DE-AZEVEDO, C. T., & FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.54-59, 2012.

GUIMARÃES, VCFV , PRUZINOVA K, SADLOVA J, VOLFOVA V, MYSKOVA J, BRANDÃO-FILHO SP, VOLF P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 159, 2016.

GUIMARÃES, J. C.; ALBERNAZ, A. P.; MACHADO, J. A.; JÚNIOR, O. A. M.; GARCIA, L. N. N. Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos do Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 13, p. 229, 2004.

HARHAY, M. O., OLLIARO, P. L., COSTA, D. L., & COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. **Veterinary Record**, v. 141, n. 10, p. 247-250, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011

HARVEY, J. W. Babesiose. In: TILLEY, L. P. & SMITH, F. W. K. Jr. *Consulta Veterinária em Cinco Minutos Espécies Canina e Felina*. 2ª ed. São Paulo. **Editora Manole LTDA**. p. 480-481, 2003.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p.101-103, 1978.

HIBLER, S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **The Compendium On Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.8 n.2 p.106-114, 1986.  
HUXSOLL, D. L. et al. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1627, 1970.

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

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38 n.11 p.4219-4221, 2000.

IVANOV, A.; TSACHEV, I. Mini-review *Hepatozoon canis* and Hepatozoonosis in the dog. **Trakia Journal of Sciences**, v. 6, n. 2, p. 27, 2008.

JOHNSON, E. M., EWING, S. A., BARKER, R. W., FOX, J. C., CROW, D. W., & KOCAN, K. M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 277-288, 1998.

KILLICK-KENDRICK, Robert. Phlebotomine sand flies: biology and control. In: **Leishmania**. Springer, Boston, MA, 2002. p. 33-43.

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

LAURENTI, M. D., ROSSI, C. N., DA MATTA, V. L. R., TOMOKANE, T. Y., CORBETT, C. E. P., SECUNDINO, N. F. C. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, p. 161-259, 1993.

LOPES, E. G., SEVÁ, A. D. P., FERREIRA, F., NUNES, C. M., KEID, L. B., HIRAMOTO, R. M., & GALATI, E. A. B. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v.145, p.2436-2444, 2017.

LLOYD, S. Environmental Influences on Host Immunity. **Ecology of Infectious Diseases in Natural Pop-ulations**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 327-361, 1995.

MACHADO, G. P.; S., D. A.; SILVA, B. F. Anaplasmoze trombocítica canina - uma breve revisão. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Julho 2010

MACHADO, G P; DAGNONE, A S; SILVA, B F. Anaplasmosse trombocítica canina—uma breve revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária [online]**, 2010.

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

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.274-287, 2008.

MAKNI, S., AYED, K., SAID, M. B., & RACHID, M. B. Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 349-355, 1989.

MARCOVAL, J., PENÍN, R. M., SABÉ, N., VALENTÍ-MEDINA, F., BONFILL-ORTÍ, M., & MARTÍNEZ-MOLINA, L. Cutaneous leishmaniasis associated with anti-tumour necrosis factor- $\alpha$  drugs: an emerging disease. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.42, p.331-334, 2017.

MAGALHÃES JUNIOR, J. T. **Aspectos vetoriais da lutzomyia longipalpis: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum***, 2015. Mestrado, UFBA, Salvador, Bahia, 2015.

MASSARD, C. A. ***Hepatozoon canis* (James, 1905)(Adeleida: Hepatozoidae) de cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora**. 1979. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MATHEW, J. S., EWING, S. A., PANCIERA, R. J., & WOODS, J. P. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson et al., 1997 to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. **Veterinary parasitology**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 1998.

MCDADE, J E. Ehrlichiosis—a disease of animals and humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.

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

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

MENEZES-SOUZA, D., CORRÊA-OLIVEIRA, R., GUERRA-SÁ, R., GIUNCHETTI, R. C., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A., REIS, A. B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 39-49, 2011.

MIRO, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., OLIVA, G., & BANETH, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v.24, p.371-377, 2008.

MORENO, JAVIER; ALVAR, JORGE. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORGADO, F.N, CAVALCANTI, A.S., MIRANDA, L. H., O'DWEYER, L. H., SILVA, M.R. L., MENEZES, R.C., SILVA, A. V. A., BOITÉ, M. C., CUPOLILLO, E., PORROZZI, R. *Hepatozoon canis* and *Leishmania* spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, September, 2016

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MOREIRA JR, E. D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393-397, 2003.

MURATA, T., INOUE, M., TAURA, Y., NAKAMA, S., ABE, H., & Fujisaki, K. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 1, p. 111-112, 1995.

MYLONAKIS, M. E., LEONTIDES, L., GONEN, L., BILLINIS, C., KOUTINAS, A. F., & BANETH, G. Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 229-233, 2005.

NARANJO, C., FONDEVILA, D., LEIVA, M., ROURA, X., & PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 133, n. 1, p. 37-47, 2005

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saint Louis: **Saunders Elsevier**. p. 203-216, 2006;

NOLI, C.; AUXILIA, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.213-232, 2005.

O'DWYER, L. H., GUIMARÃES, L., & MASSARD, C. L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.4, n.2, p.83-84, 1997.

OLIVEIRA, T.M.F.S; FURUTA, P.J; CARVAL H.O, 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, p.7 - 11, 2008.

OLIVEIRA, L. C. P. D., ARAÚJO, R. R. D., ALVES, C. R., MOUTA-CONFORT, E., LÓPEZ, J. A., & MENDONÇA-LIMA, F. W. D. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Avila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.

PALUDO, G. R., DELL'PORTO, A., E TRINDADE, A. R. D. C., MCMANUS, C., & FRIEDMAN, H. *Hepatozoon spp.*: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3-4, p. 243-248, 2003

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, p.1184–1191, 2010.

PAHO, W.; P.A.H.O. Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. **Pan American Health Organization**, 2014. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=21608&Itemid](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&Itemid). Acesso em: 21 de julho de 2019.

PANARO, M. A., BRANDONISIO, O., CIANCIULLI, A., CAVALLO, P., LACASELLA, V., PARADIES, P., & OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v. 136, n. 8, p. 823-831, 2009.

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

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

PENAFORTE, K. M., BELO, V. S., TEIXEIRA-NETO, R. G., RIBEIRO, R. A. N., OLIVEIRA, R. B. D., SCHETTINI, D. A., & SILVA, E. S. D. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 592-596, 2013.

PENNISI MG. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 35-47, 2015.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G., & RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica, Basel**, v. 107, p. 66-69, 2008.

PREZIOSI, DIANE E.; COHN, LEAH A. The increasingly complicated story of Ehrlichia. **Compendium On Continuing Education For The Practising Veterinarian-North American Edition-**, v. 24, n. 4, p. 277-291, 2002.

QUILEZ, J., MARTÍNEZ, V., WOOLLIAMS, J. A., SANCHEZ, A., PONG-WONG, R., KENNEDY, L. J., & ALTET, L. Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35349, 2012

Ramos, R. A. N., Latrofa, M. S., Giannelli, A., Lacasella, V., Campbell, B. E., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 285-288, 2014.

RAMOS, R. A. D. N., PIMENTEL, D. D. S., LIRA, N. M. S. D., SANTANA, M. D. A., FAUSTINO, M. A. D. G., & ALVES, L. C. Avaliação da biópsia de medula óssea esternal e ílfaca no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal.**, p. 13-16, 2012

RAMOS, R., RAMOS, C., ARAÚJO, F., OLIVEIRA, R., SOUZA, I., PIMENTEL, D. & ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology research**, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, 2010.

REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., VALE, A. M., MARQUES, M. J., GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., & MARTINS-FILHO, O. Alsotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.102-116, 2006.

RIBEIRO, F. C., SCHUBACH, A. D. O., MOUTA-CONFORT, E., PACHECO, T. M., DE FÁTIMA MADEIRA, M., DE SOUZA ABBoud, L. C., & MARZOCHI, M. C. A utilização do ELISA empregando antígenos homólogos e heterólogos para a detecção de IgG e subclasses (IgG1 e IgG2) no diagnóstico de Leishmaniose visceral canina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 5, p. 283-289, 2011.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária**, v.71, p.66-76, 2007.

RISTIC M. Anaplasmosis. In Weinman D, Ristic D. (editors) *Infectious Blood Diseases of Man and Animals* New York, USA: **Academic Press**; pp.473–542, 1968.

RUBINI, A. S., DOS SANTOS PADUAN, K., LOPES, V. V. A., & O'DWYER, L. H. MOLECULAR and parasitological survey of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. **Parasitology research**, v. 102, n. 5, p. 895, 2008.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041, 2002.

SCHETTERS, TH. P. M., MOUBRI, K., PRÉCIGOUT, E., KLEUSKENS, J., SCHOLTES, N. C., GORENFLOT, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**. v. 115, p. 485-493, 1997.

SILVA, JENEVALDO B., LOPES, CINTHIA T. A., PINHEIRO, CLEYTON P., LIMA, DANILO H.S., SILVA, ROBERTO S. L., FONSECA, ADIVALDO H., ARAÚJO, FLÁBIO R., BARBOSA-NETO, JOSÉ D. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 7, p. 847-850, July 2013.

SILVEIRA, A. P. S., VIEIRA, V. B. D., BATALINI, L. S., DO CARMO, S. B., FRIOZI, E., DE ARRUDA, E. J., NEITZKE-ABREU, H. C. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 51(6), p. 843-847, Nov-Dec, 2018.

SIMPSON, R. M.; GAUNT, S. D.; HAIR, J. A.; KOCAN, K. M.; HENK, W. G.; CASEY, H. W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. **American journal of veterinary research**, v. 52, n. 9, p. 1537-1541, 1991.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases. **Veterinary Quarterly**, v. 10, p. 1-16, 1988.

SOLANO-GALLEGO, L., MIRÓ, G., KOUTINAS, A., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., & BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasite & Vectors**, v.4, p.1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., & BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

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

SILVA, VLD. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental.** 2001. 102f. 2001. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado

em Patologia Veterinária Experimental e Comparada)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOLANO-GALLEGO, L., FERNANDEZ-BELLON, H., MORELL, P., FONDEVILA, D., ALBEROLA, J., RAMIS, A., & FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of comparative pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004;

SOLANO-GALLEGO, L., RIERA, C., ROURA, X., INIESTA, L., GALLEGU, M., VALLADARES, J. E., & ARBOIX, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary parasitology**, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001;

SOLANO-GALLEGO L, LLULL J, RAMOS G, RIERA C, ARBOIX M, ALBEROLA J, FERRER L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000;

SOUSA, K. C. M. D **Co-infecção por *Ehrlichia canis*, *Leishmania chagasi* e *Babesia canis* em cães naturalmente infectados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2012. Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2012

SOUZA, D. M., COTA, R. G. D. S., CARNEIRO, C. M., SOUZA, J. V. D., GIUNCHETTI, R. C., CARVALHO, A. T. D., REIS, A. B. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. p. 1566, v. 6, 2012

SOUZA, A. I.; DAGNONE, A. S.; MACHADO, R. Z. Infecção por *Anaplasma platys* em cães de Campo Grande – MS. Infecção por *Anaplasma platys* em cães de Campo Grande-MS, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 13, p. 352, 2004.

SOUZA, B. M. P. D. S., LEAL, D. C., BARBOZA, D. C. P. M., UZÊDA, R. S., ALCÂNTARA, A. C. D., FERREIRA, F. & FRANKE, C. R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

TABOADA, JOSEPH; MERCHANT, S. R. Infecções por protozoários e por outras causas. ETTINGER, SJ; FELDMAN EC **Tratado de medicina interna veterinária**, v. 4, p. 554-572, 1997.

TILLEY, LARRY PATRICK; SMITH, FRANCIS WK; FRANCIS, W. K. Consulta veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina. 2003.

TOMMASI AS, BANETH G, BREITSCHWERDT EB, DANTAS-TORRES F, OTRANTO D, DE CAPRARIIS D. *Anaplasma platys* in bone marrow

megakaryocytes of young dogs. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2231-2234, 2014.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F. F.; PERIÉ, N. M.; SPANJER, A. A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**., v. 11, p. 33-40, 1989.

UNGAR DE SÁ, M. F. M.; UNGAR DE SÁ, J. E.; BITTENCOURT, D. V. V; BISPO, A.C.; RÉGIS, A. M. M.; SOUZA FILHO, N. J.; GOMES NETO, C. M. B.; SOUZA, B. M.P. S.; BITTENCOURT, T. C. C.; FRANKE, C. R. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 178-183, 2007.

VASCONCELOS M. F. **Estudo da infecção por Babesia spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, 2010.

VINCENT-JOHNSON, N. A., MACINTIRE, D. K., LINDSAY, D. S., LENZ, S. D., BANETH, G., SHKAP, V., & BLAGBURN, B. L. A new Hepatozoon species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **The Journal of parasitology**, p. 1165-1172, 1997.

VOYVODA H.; PASA S.; UNER A. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. **Journal of small animal practice**, v. 45, n. 12, p. 613-617, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis: Epidemiological situation, 2016. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> em 21 julho 2019.

WOODY, B. J.; HOSKINS, D. J. Ehrlichial diseases of dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 21, n. 1, p. 75-98, 1991.

## **CAPÍTULO I**

### **DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE *Leishmania infantum*: NA AUSÊNCIA DE MEDULA ÓSSEA, QUAL MELHOR AMOSTRA BIOLÓGICA?**

# DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE *Leishmania infantum*: NA AUSÊNCIA DE MEDULA ÓSSEA, QUAL MELHOR AMOSTRA BIOLÓGICA?

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar qual melhor amostra a ser utilizada para pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania spp*, na ausência da citologia de medula óssea. Foram utilizados 29 cães, de raças e idades variadas provenientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Pernambuco reagentes ao teste Dual Path Platform (DPP® Bio Manguinhos) e parasitológico positivo na citologia direta da medula óssea. Amostras positivas em medula óssea (MO) e linfonodo corresponderam a 61,1% (22/29), para MO e pele 47,2% (17/29) e swab conjuntival e MO 33,3% (12/29) (Tabela 1). Para margem de erro fixada (5%) foram registradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados do exame da medula com swab e com pele. Amostras positivas em medula óssea e linfonodo corresponderam a 61,1% (22/29), para MO e pele 47,2% (17/29) e swab conjuntival e MO 33,3% (12/29), sendo as amostras de linfonodo a melhor amostra menos invasiva.

Palavras chave: Diagnóstico; Leishmaniose Visceral Canina; Pesquisa direta;

## 1.INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por um protozoário denominado *Leishmania infantum* e tem como vetores dípteros da subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003, LOPES et al, 2017). Os cães, principais reservatórios em áreas urbanas, podem desenvolver a Leishmaniose Visceral (LVC) podendo apresentar sinais clínicos variáveis e inespecíficos, o que demonstra uma cautela em que fazer o diagnóstico na rotina ambulatorial (QUEIROZ et al., 2010; CUNHA et al., 2014, GODOY et al., 2016; GUIMARAES, 2017).

Entre os métodos de diagnóstico parasitológico da LVC temos a citologia direta, que é considerada “padrão ouro”, sendo a observação de formas amastigotas de *Leishmania sp* rápida e prática, com 100 % de especificidade, embora apresente sensibilidade variável (GENARO, 1993; SILVA, 2007; GREENE, 2012). A cultura e a imunohistoquímica, também são métodos parasitológicos mas não são normalmente

empregadas na rotina clínica veterinária, uma vez que demandam tempo, estrutura laboratorial e mão-de-obra qualificada que torna estes processos onerosos e menos práticos (XAVIER et al., 2006; RAMOS-VARA et al., 2008; QUINNELL et al., 2009).

O diagnóstico da LVC, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, é realizado por meio de métodos sorológicos: Dual Path Platform (DPP) – BioManguinhos/Fundação Oswaldo Cruz® como triagem e o ELISA como teste confirmatório (GRIMALDI et al., 2012; BRASIL, 2014). No entanto, a interpretação destes resultados requer experiência do Médico Veterinário, uma vez que pode ocorrer reações cruzadas com outros agentes infecciosos como, por exemplo: *Trypanosoma caninum*, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp (RIBEIRO, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BARROS et al, 2012). Este desafio diagnóstico pode gerar resultados falsos positivos e não são 100% sensíveis e específicos (RIBEIRO, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BARROS et al, 2012).

A medula óssea, principalmente a esternal, embora tenha praticidade e rapidez, apresenta limitações, por ser uma técnica invasiva e traumática, que requer muitas vezes sedação, além de treinamento para realização da coleta (SUNDAR & RAI, 2002, RAMOS, 2012). Sabe-se que outros locais podem servir como coleta, como linfonodo, pele e suabe conjuntival (SILVA, 2007; GREENE, 2012).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico da LVC na rotina clínica veterinária e garantir um resultado o a maior sensibilidade possível, objetivou-se com este trabalho avaliar qual melhor amostra a ser utilizada para pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania* spp, na ausência da citologia de medula óssea.

## **2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) registrado sob a licença de número 011/2019.

### **2.2 Triagem dos Animais**

Foram utilizados 29 cães, de raças e idades variadas provenientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Pernambuco entre Janeiro de 2018 e Maio de 2019. Todos selecionados foram reagentes ao teste Dual Path Platform (DPP® Bio



Manguinhos) apresentaram parasitológico positivo na citologia direta da medula óssea.

### 2.3 Diagnóstico Parasitológico

Foram realizadas citologias esfoliativas de pele lesionada, punção aspirativa de medula óssea, aspirado de linfonodo poplíteo e suabe de conjuntiva ocular. Realizou-se esfregaços em lâminas de microscopia e coloração do tipo Romanowsky. Após, examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de *L. infantum*.

### 2.4 Métodos Estatísticos

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais. Para avaliar diferença entre os exames realizados utilizou-se o teste Qui-quadrado de Mc-Nemar. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. O programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

## 3.RESULTADOS

Amostras positivas em medula óssea (MO) e linfonodo corresponderam a 61,1% (22/29), para MO e pele 47,2% (17/29) e suabe conjuntival e MO 33,3% (12/29) (Tabela 1). Para margem de erro fixada (5%) foram registradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados do exame da medula com suabe e com pele.

Tabela 1 – Presença ou ausência de formas amastigotas de *Leishmania sp* em medula óssea, linfonodo, swabe conjuntival e pele de cães, através do método direto.

Variável	Medula				Valor p
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
<b>Linfonodo</b>					$p^{(1)} = 0,549$
Positivo	22	61,1	4	11,1	
Negativo	7	19,4	3	8,3	
<b>Suabe conjuntival</b>					$p^{(1)} < 0,001^*$
Positivo	12	33,3	-	-	
Negativo	17	47,2	7	19,4	
<b>Pele</b>					$p^{(1)} = 0,035^*$

Positivo	17	47,2	3	8,3
Negativo	12	33,3	4	11,1

---

(\*) Diferença significativa a 5%  
(1) Através do teste Exato de Mc-Nemar.

#### 4.DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios para o diagnóstico da Leishmaniose, principalmente no método direto, é a escolha da melhor amostra. De acordo com os resultados encontrados, as amostras de linfonodo apresentaram maior positividade levando em consideração a MO, e conseqüentemente foram observados menos falso negativos (7/29), representando uma boa opção para coleta e diagnóstico. Apesar da punção medular apresentar sensibilidade variando entre 60 e 85% (FERRER, 2002; SUNDAR e RAY, 2002), Braz et al., (2016) obtiveram valores em que as amostras de linfonodo representaram o maior número de animais positivos à doença, (44%), e Saridomichelakis et al. (2005) relataram que o linfonodo foi positivo em 83,3% dos cães sintomáticos, também sendo a maioria. O sistema hemolinfático é o primeiro envolvido e é caracterizado pela linfadenomegalia, sinal clínico mais presente na LVC, apontado por diversos estudos (LUVIZOTTO, 2006; DIAS, 2008; FREITAS et al., 2012; PALTRINIERI et al., 2016), podendo explicar a alta positividade nas amostras de linfonodo.

Diferentes fatores podem levar a esta diferença entre positividade da medula e linfonodo, como a carga parasitária, a espécie de *Leishmania* envolvida, o tempo de evolução da lesão, qualidade do material coletado, a hemodiluição no momento da coleta de amostras da MO, o tipo de corante utilizado, o tempo e o número de campos microscópicos examinados e a experiência do profissional que realiza o exame (RAMIREZ et al., 2000; CASTILLO & ROJAS, 1997; FARIA; ANDRADE, 2012). Com relação a combinação entre os resultados encontrados quando as duas amostras, medula óssea e linfonodo, são utilizadas, a sensibilidade pode ser de 71% a 91% (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 2001).

Andrade et al. (2006) e Dias et al., (2019) não observaram diferença estatísticas significativas entre baço, linfonodo e medula óssea, e medula óssea, linfonodo e sangue, respectivamente.

A pele foi o local que apresentou segunda maior positividade, após as amostras de linfonodo. Apesar de não ter sido definido um local de eleição para coleta em pele de Cães com LV, já foi demonstrado parasitismo na pele do focinho, pavilhão auricular, abdômen e escápula (DEANE & DEANE 1955; MADEIRA et al., 2004; MADEIRA et al., 2006; XAVIER et al., 2006; VERÇOSA et al., 2008; MADEIRA et al., 2009; CALABRESE et al., 2010). Santos, (2011) visualizou formas amastigotas tanto em pele integra como lesionada, sendo esta última obtendo positividade em todas as amostras, e a integra apresentando baixa sensibilidade, sendo então variável a sensibilidade dependendo do tempo da evolução dermatológica da doença. A pele foi considerada por Abranches et al. (1991) um importante reservatório para parasitos em cães infectados, saudáveis e doentes, além de ter um importante papel na transmissão da LV, pois a alta carga do parasito é acessível ao vetor flebotomíneo (DEANE E DEANE, 1962) e a carga parasitária pode ser influenciada pela resposta inflamatória, como descrito por Calabrese et at. 2010, onde cães com lesões inflamatórias acentuadas, com presença principalmente de mastócitos, apresentaram baixa carga parasitária em comparação com a pele de reação inflamatória leve, composta de macrófagos, com carga maior.

No presente trabalho todas amostras foram coletadas de pele lesionada, se mostrando então, um local de eleição para diagnóstico, após pele e linfonodo.

A citologia da conjuntiva foi a que apresentou o menor número de positivos. A presença de sinais oftálmicos em cães com leishmaniose é estimada em 16 a 80% dos animais doentes (MOLLEDA *et al.*, 1993; CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999; PEÑA *et al.*, 2000). O resultado neste trabalho foi superior ao encontrado por Peña et al., (2000) que obtiveram 18,8% de positivos ao realizarem a citologia de esfregaços conjuntivais em cães com alterações oftálmicas decorrentes da leishmaniose. Já os valores do presente trabalho se aproximaram do encontrado em animais sem sinais oculares (38,1%) observados por Barbosa et al., (2012), porém, menores que nos animais com sinais oculares (60%) do mesmo trabalho. Por ser um método simples, pouco invasivo e minimamente estressante para os animais (OLIVEIRA et al., 2015), é uma vantagem para ser utilizada na rotina de diagnóstico, porém há chances de falso negativos.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que na ausência da citologia medular, a citologia de linfonodo é a melhor opção para diagnóstico da LVC, seguida da pele e, por último, swab conjuntival, de forma rápida e menos invasiva.

## 6. REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P.; SANTOSGOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. An Experimental-Model for Canine Visceral Leishmaniasis.

**Parasite Immunol**, v. 13, n. 5, p. 537-550, Sep 1991.

ANDRADE, H. M., REIS, A. B., SANTOS, S. L., VOLPINI, A. C., MARQUES, M. J., & ROMANHA, A. J. Use of PCR–RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 231-238, 2006.

BARBOSA, V.T.; SILVA, M.A.G.; GERING, A.P.; SANTOS, H.D.; LAUS, J.L. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 64 (6), 1465 – 1470, 2012.

BARROS, J. H. S., ALMEIDA, A. B. P. F., FIGUEIREDO, F. B., SOUSA, V. R. F., FAGUNDES, A., PINTO, A. G. D. S. MADEIRA, M. D. F. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.419-423, 2012.

BRAZ, P H; DE LIMA, M A M; MAIA, J S. Sensibilidade parasitológica de diferentes locais de colheita para o diagnóstico de leishmaniose em cães. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 2, 2016.

CALABRESE, K. S., CORTADA, V. M. C. L., DORVAL, M. E. C., LIMA, M. S., OSHIRO, E. T., SOUZA, C. S. F., & ABREU-SILVA, A. L. Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 3, p. 253-257, 2010.

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

CASTILLO, C M; ROJAS, C. Evaluation of popular stains for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 531-532, 1997.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using Leishmania donovani s.l.- 16 specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.12-17, 2004

CUNHA, R M. et al. Envolvimento do *Desmodus rotundus* no ciclo epidemiológico das leishmanioses na Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p.774-781, 2014.

DE ALMEIDA FERREIRA S, LEITE RS, ITUASSU LT, ALMEIDA GG, SOUZA DM. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, 2012

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 198-212, May-Jun 1962.

DIAS C. A. **Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com Leishmaniose Visceral naturalmente infectados no Distrito Federal**. Brasília, 2008. 82p.: il. Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan- Amazônica de Saúde**. Minas Gerais, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FERRER L. Clinical aspects of canine leishmaniosis: an update. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, 1999. **Sevilla: Hoechst Roussel Vet**; p. 6-10, 2002.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniosis: an update|| Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum [G1. **Barcelona: Hoechst Roussel Vet**, v. 6, n. 10, 1999.

FREITAS, J. C. C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.5, p.24-29, 2012.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, p. 23-51, 2003.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 220f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GODOY, K. C. S., BRAZ, P. H., ASSIS, A. R., ANTUNES, T. R., GOMES, D. C., & SOUZA, A. I. Avaliação dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Online), v. 68, n.2, p. 313-320, 2016.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4. ed. [s.l.] Elsevier/Saunders, 2012.

GRIMALDI JR, G., TEVA, A., FERREIRA, A. L., DOS SANTOS, C. B., PINTO, I. D. S., DE-AZEVEDO, C. T., & FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.54-59, 2012.

GUIMARÃES, A., RAIMUNDO, J. M., SANTOS, H. D., MACHADO, R. Z., & BALDANI, C. D. Serosurvey for canine visceral leishmaniasis in rural and urban areas of the Brazilian Legal Amazon. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 21, p.207-208, 2017.

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

LOPES, E. G., SEVÁ, A. D. P., FERREIRA, F., NUNES, C. M., KEID, L. B., HIRAMOTO, R. M., & GALATI, E. A. B. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v.145, p.2436-2444, 2017.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados [abstract]. *In: Anais do I Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina*; Jaboticabal, São Paulo, 2006.

MADEIRA, M. F., FIGUEIREDO, F. B., PINTO, A. G. S., NASCIMENTO, L. D., FURTADO, M., MOUTA-CONFORT, E. & PASSOS, S. R. L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in veterinary science**, v. 87, n. 2, p. 260-262, 2009.

MADEIRA, M. D. F., SCHUBACH, A., SCHUBACH, T. M. P., PACHECO, R. S., OLIVEIRA, F. S., PEREIRA, S. A., & MARZOCHI, M. C. A. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

MADEIRA, M. D. F., SCHUBACH, A. D. O., SCHUBACH, T. M. P., LEAL, C. A., & MARZOCHI, M. C. D. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.

MAIA C, NUNES M, CRISTOVAO J, CAMPINO L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta tropica**, v. 116, n. 3, p. 193-199, 2010.

MANNA L, REALE S, VITALE F, PICILLO E, PAVONE LM, ET AL. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 279-282, 2008.

MOLLEDA, J. M., NOVALES, M., GINEL, P. J., & FERNANDEZ, A. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 173-173, 1993.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.45, p.552-578, 2016.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, p.1184–1191, 2010.

PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dog: 105 cases 1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.3, p.35-41, 2000.

QUINNELL, Rupert J.; COURTENAY, Orin. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; BUZETTI, W. A. S. Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISAtest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32- 38, jan.-mar. 2010.

RAMÍREZ JR, AGUDELO S, MUSKUS C, ALZATE JF, BERBERICH C, BARKER D, VELEZ ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3768-3773, 2000.

RAMOS, R. A. D. N., PIMENTEL, D. D. S., LIRA, N. M. S. D., SANTANA, M. D. A., FAUSTINO, M. A. D. G., & ALVES, L. C. Avaliação da biópsia de medula óssea esternal e ilíaca no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal.**, p. 13-16, 2012

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

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

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária**, v.71, p.66-76, 2007.

SANTOS, Isabele Barbieri dos et al. **Comparação entre a citopatologia, histopatologia, imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes**

**amostras biológicas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2011.  
Tese de Doutorado.

SARIDOMICHELAKIS, M. N., MYLONAKIS, M. E., LEONTIDES, L. S., KOUTINAS, A. F., BILLINIS, C., & KONTOS, V. I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 1, p. 82-86, 2005.

SILVA, S. M. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) submetidos a um protocolo terapêutico em uma Clínica Veterinária de Belo Horizonte.** [Dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L. & BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO L, RODRIGUEZ-CORTES A, TROTTA M, ZAMPIERON C, RAZIA L Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 315-319, 2007

SUNDAR S, RAI M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Sep; v. 9(5) p. 951-8, 2002

VERÇOSA BL, LEMOS CM, MENDONÇA IL, SILVA SM, DE CARVALHO SM, GOTO H., Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC veterinary research**, v. 4, n. 1, p. 45, 2008.

XAVIER SC, ANDRADE HM, HADAD S, CHIARELLI I, LIMA WG, MICHALICK MSM. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC veterinary research**, v. 2, n. 1, p. 17, 2006.



## **CAPÍTULO II**

### ***Hepatozoon canis* AND *Babesia vogeli* INFECTING DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS**

# EVALUATION OF *Hepatozoon canis* AND *Babesia vogeli* COINFECTION IN DOGS WITH NATURAL INFECTION OF *Leishmania infantum*

## ABSTRACT

The study was conducted in the state of Pernambuco and 72 dogs from January of 2018 to May 2019, of different breeds and ages positive for *L. infantum* were used through the Dual Path Platform (DPP® Bio Manguinhos) and direct parasitological examination. Hematozoa were researched by direct examination and molecular biology. Of the animals analyzed in the direct hematozoan survey only 1.39% (1/72) were positive for *H. canis*. In the PCR reaction for hematozoa was observed 8.33% (6/72) positive for *H. canis* and 2.78% (2/72) positive for *B. canis*. There was no coinfection among hemoparasitic diseases in molecular diagnosis. The paper reports the first report of coinfection of positive animals for *L. infantum* in coinfection with *Hepatozoon canis* and *Babesia canis* in Pernambuco State.

## 1. INTRODUCTION

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an immunomediated, chronic parasitic disease, whose etiological agent in Brazil is *Leishmania (Leishmania) infantum* which is transmitted by *Lutzomyia longipalpis* (ARIAS, 1996).

In endemic areas, dogs, immunosuppression caused by *L. infantum*, during active disease, associated with malnutrition and changes in the myeloid system may be responsible for the development of secondary infections, increasing the susceptibility to various opportunistic or non-opportunistic parasitic infections. (Andreotti et al., 2005).

Thus, reports of coinfection in animals with CVL by *Dirofilaria immitis* (MAIA et al., 2016), *Demodex sp.* (MOZOS et al., 1999), *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Mycoplasma haemocanis*, *Rickettsia coronii*, *Babesia sp.*, *Hepatozoon sp.*, *Toxoplasma gondii* (OLIVEIRA et al., 2017; ATTIPA et al., 2018; BAXARIAS et al., 2018, ATTIPA et al., 2018), have been described. However, little has been described

about the co-infection of other arthropod-borne pathogens in dogs with natural *L. infantum* infection in northeastern of Brazil.

The presence of co-infection with more than one parasitic or infectious pathogens has been a common finding in tropical and subtropical areas where there are some vectors and the simultaneous transmission occurs among dogs (YISASCHAR-MEKUZAS et al.), particularly *Babesia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* in various regions of Brazil (Oliveira et al., 2008; Paulan et al., 2013; Gonçalves et al., 2014).

In Pernambuco the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (sl) acts as a biological vector of a number of these agents (Dantas-Torres, 2008) such as *Hepatozoon sp* and *Babesia canis vogeli* (Dantas-Torres et al. 2004; Ramos et al 2010; Araujo et al., 2015). Despite the same vector, *Hepatozoon sp.* occurs by ingestion of the tick (MAKIMURA; KINJO, 1991; MURATA et al., 1993; BANETH; WEIGLER, 1997), while *B. canis* is transmitted at the time of tick blood repast (CARRET et al., 1999; LOBETTI 1998; ALMOSNY 2002)

Given the similarity of some clinical signs between babesiosis, hepatozoonosis and visceral leishmaniasis, allied to the presence of cross-reactions in serological tests (FERRER et al., 1995; MANCIANTI et al., 1996; GOMES; CORDEIRO, 2004; CIARAMELLA et al. , 1997; MANA et al, 2009; FERREIRA et al. 2007), besides repercussion of the general stage of the animal TUTTLE et al., 2003; Baneth et al., 2015), the conclusive diagnosis reinforces the importance of diagnostic methods that differentiate the pathogens involved.

Thus, the objective of this work was to evaluate the coinfection through the direct and molecular diagnosis of *H. canis* and *B. canis* in dogs with natural infection by *L. infantum*

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Study area and ethical approval**

The study was conducted in were attendant in the Small Animal Hospital from Federal Rural University of Pernambuco State. This study was approved by the Institutional Animal Ethics Committee- CEUA/UFRPE (approval ID number 011/2019). The experimental procedures were carried out in accordance of the Brazilian regulations relating to experimental biology and medicine.

## 2.2 Animal and sampling

Seventy-two domiciliated dogs of varying age and race, from January of 2018 to May 2019 were used. All dogs with *L. infantum* infection was determined by clinical, parasitological (bone marrow biopsy, lymph node, skin scarification, blood) and serological (immunocroatographic rapid test DPP®) diagnoses. All dogs were also evaluated for the presence of clinical signs associated with other vector borne disease and it was made a parasitological diagnosis by thin blood smears.

## 2.3 Laboratory procedures

The collected whole blood was frozen and kept at -20°C for subsequent DNA extraction. For the extraction of DNA from blood the kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), were used according to the manufacturer's recommendations. The primers BAB143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') BAB694-667 (5'-GCTTGAAACACTCTARTTTCTCAAAG-3') HEPF (5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3') and HEPR (5'-ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG-3') were used.

After amplification, the PCR product was stained with *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotechnology), plotted on 2% agarose gel and placed in trisacetate-EDTA (1X) buffer electrophoresis vat (LGC Biotechnology) for later visualization under ultraviolet light.

## 2.4 Data analysis

The data were analyzed descriptively using absolute and percentage frequencies.

## 3.RESULTS

All animals were positive by at least in one parasitological test (bone marrow biopsy, lymph node, skin scarification) and 100% were positive for immunocroatographic tests for Leishmaniose. Clinical examination conducted at the time of blood sample collection revealed that all dogs did not show any clinical signs of babesiosis or hepatozoonosis. The blood smear examination showed 1.39% (1/72)

samples positive just for *H. canis* (Figure 1). Detection by PCR of pathogenic protozoa showed 8.33% (6/72) for *H. canis*. and 2.78% (2/72) of samples positive for *B. canis*.

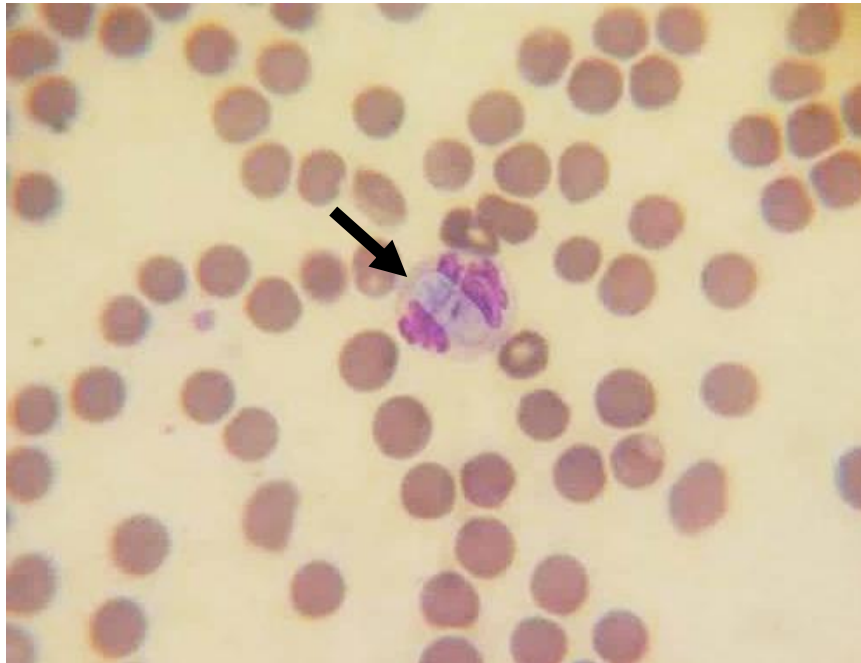


Figure 1. Romanowsky-type stained blood smear showing *Hepatozoon canis* gamonts (arrow) within a neutrophil x 100

## 1. DISCUSSION

In endemic areas visceral leishmaniasis in dogs can be easily diagnosed by parasitological methods from different samples presenting a divergent parasite burden, even being considered the gold standard (MAIA and CAMPINO, 2008; LAURENTI, 2009) they still have low sensitivities when compared with serologic tests.

In point of clinical signs, Babesia infections in domestic dogs include not only animals with acute or chronic babesiosis syndrome, but also asymptomatic carriers, which one of them may show laboratorial changes (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; KRAWCZAK et al., 2015).

On the other hand, only a small proportion of animals were positive for *H. canis* by parasitological examination. A thin blood smears are most useful for detecting the presence of blood parasites in veterinary medicine, but they present low sensitivity

(HARRUS et al., 1997), because the circulating parasite burden usually is less than 1% (CADMAN et al., 1994).

In Brazil, the infection with *H. canis* and *B. canis vogeli* has been observed in various states, and many of these areas are also endemic for visceral leishmaniasis in dogs (BASTOS et al., 2004, TRAPP et al., 2006, DANTAS-TORRES et al., 2006 RUBINI et al., 2008, MIRANDA et al., 2014, RAMOS et al., 2015; MORGADO, 2016), but only two reports were made by co-infection of *H. canis* and *L. infantum* at the same dog by parasitological diagnosis in different regions of Brazil (ANTUNES et al. 2015; DEMONER et al., 2016).

Otherwise, the detection by PCR of pathogenic protozoa showed the amplicons compatible to *H. canis* and *B. canis*. The result of the present study for *H. canis* (8.33%) was higher than that reported by Baxarias et al. (2018), who found only 1.3% positivity for *H. canis* in dogs positive for Leishmaniasis in Spain, where a large frequency of vectors is found, suggesting the same distribution curve of diseases transmitted by these vectors. However, regardless of whether the values found here are also higher than Rojas et al. (2014) who observed a prevalence of 7.5% or less than those found by Medkour et al. (2020) who obtained 16% of *H. canis* co-infection in Costa Rica and North Africa respectively, it should be considered that animal lifestyle is a risk factor for coinfection, in addition to exposure to disease vectors.

In Brazil, *H. canis* infection has been described in endemic areas for CVL such as São Paulo (RUBINI et al., 2008; DEMONER et al., 2016), Minas Gerais (MIRANDA et al., 2014), Mato Grosso in the South (RAMOS et al., 2015; MORGADO, 2016) and Rio Grande do Norte (GONÇALVES et al., 2014), through molecular methods, but co-infection was only reported in the Northeast and dogs and their ticks, (GONÇALVES et al., 2014) and in the Brazilian Midwest where the animals presented clinical and histopathological alterations (ANTUNES et al, 2015; MORGADO et al. 2016).

The PCR is an excellent tool for directly identifying some pathogens, include *H. canis* (RUBINI et al., 2005; LASTA, 2008) not only because the sensitivity and specificity, but also capability to detect DNA as low as of 4.5 ng/μL (ADAO et al., 2017).

Although the PCR showed 8.33% of positive samples for *H. canis* from Pernambuco State, and Ramos et al., (2010) have been detected a *H. canis* infection

rate of only 0.48% in dogs the immunosuppression in visceral leishmaniasis in dogs should be responsible for different rates of prevalence of this pathogen.

PCR results for *B. canis* coinfection (2.78%) were close to those found by Medkour et al (2020), which detected multiple *B canis* and *L infantum* infection in 2.2% (5/227) of dogs evaluated in the north. from Africa.

In Brazil, *B. canis* infection in dogs with visceral leishmaniasis was reported by Sousa et al (2013), who obtained 1.6% co-infected in Mato Grosso do Sul, and Melo (2016) and Gama-Melo et al. (2019) both observed only one case of co-infection between *B. canis* and *L. infantum* in Minas Gerais.

The same way of *H. canis* the PCR presents high sensitivity and specificity to *B. canis* detecting DNA as lower as of 19,5 ng/μL (ADAO et al., 2017).

Although the PCR showed 2.78% of positive samples for *B. canis* in dogs with natural infection of *L infantum* from Pernambuco State, Ramos et al., (2010) and Araujo et al. (2015) observed the *B canis* prevalence ranging 7,31% and 57,9% respectively. The different methods may cause difference between percentages, considering that no dogs are used positive for LVC, but reveals that *B. canis* is present in increasing state.

The diagnosis of hematozoa coinfection in dogs with natural *L infantum* infection is very important for the small animal clinicians, since dogs with leishmaniasis may present haematological abnormalities similar to infection by *H. canis* and *B. canis*. Thus, the detection of these hematozoa can contribute to an appropriate therapeutic approach reducing the death of animals with leishmaniasis.

## 5. CONCLUSION

The study is the first report of coinfection of dogs with natural infection with *L. infantum* with *H. canis* and *B. canis* in Pernambuco State, Brazil, showing the importance in the clinic of small animals, so that it is the correct diagnosis and treatment.

## 6. REFERENCES

ALMEIDA, A. P. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus*v (Acari: Argasidae). **Ticks Tick Borne Disease**, v. 3, n. 4, p. 203-206, 2012.

ANTUNES T. R., VALENÇOELA R. A., SORGATTO S., OLIVEIRA B. B., GODOY K. C. S., SOUZA A. I. Aspectos hematológicos e epidemiológicos de cães naturalmente infectados por *hepatozoon sp.* no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.3, p.234-238, 2015

ARAÚJO, A. C., SILVEIRA, J. A. G., AZEVEDO, S. S., NIERI-BASTOS, F. A., RIBEIRO, M. F. B., LABRUNA, M. B., & HORTA, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 456-461, 2015.

BANETH, G., FLORIN-CHRISTENSEN, M., CARDOSO, L., & SCHNITTGER, L. Reclassification of Theileria annae as Babesia vulpes sp. nov. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 207, 2015.

BANETH G, HARRUS S, GAL A, AROCH I. Canine vector-borne co-infections: Ehrlichia canis and Hepatozoon canis in the same host monocytes. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 30-34, 2015.

BANETH G. Hepatozoonosis. In: Greene C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Georgia: Saunders; p. 750-756, 2011.

BANETH G, KOUTINAS AF, SOLANO-GALLEGO L, BOURDEAU P, FERRER. L. *Canine leishmaniosis* - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BASTOS, C. V.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 158-160, 2004.

BAXARIAS M., ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ A., MARTÍNEZ-ORELLANA P., MONTSERRAT-SANGRÀ S., ORDEIX L., ROJAS A., NACHUM-BIALA Y., BANETH B., SOLANO-GALLEGO L., Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniosis? **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 135, 2018.

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

DE TOMMASI AS, OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, CAPELLI G, BREITSCHWERDT EB, DE CAPRARIIS D. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs?. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 97, 2013.

CARDOSO, L., 2011. Parasites & Vectors LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

FERREIRA, E. C., LANA, M., CARNEIRO, M., REIS, A. B., PAES, D. V., SILVA, E. S., SCHALLIG, H., & GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235-241, 2007.



GONÇALVES, L. R., FILGUEIRA, K. D., AHID, S. M. M., PEREIRA, J. S., VALE, A. M., MACHADO, R. Z., & ANDRÉ, M. R. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014.

HARRUS, S., AROCH, I., LAVY, E., & BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, n. 10, p. 247-250, 1997.

HOFMANN, M., HODŽIĆ, A., POULIOU, N. JOACHIN, A., Vector-borne pathogens affecting shelter dogs in eastern Crete, Greece. **Parasitology research**, v. 118, n. 5, p. 1661-1666, 2019

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

LABRUNA, M. B., & PEREIRA, M. C. (2001). Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, 30, 24-32. MANCIANTI, F., PEDONESE, F., & POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.

LOPES, E. G., SEVÁ, A. D. P., FERREIRA, F., NUNES, C. M., KEID, L. B., HIRAMOTO, R. M., & GALATI, E. A. B. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v.145, p.2436-2444, 2017.

LOPES, M.G.; KRAWCZAK, F.D.S.; LIMA, J.T.R.D.; FOURNIER, G.F.D.S.R.; ACOSTA, I.D.C.L.; RAMIREZ, D.G.; GENNARI, S.M. Occurrence of Ehrlichia canis and Hepatozoon canis and probable exposure to Rickettsia amblyommatis in dogs and cats in Natal, RN. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 151-156, 2019.

MAIA, M. O., DE FREITAS, A. L. S., SANTOS, J. G., DOS ANJOS PACHECO, T., DE SOUZA RAMOS, D. G., DA SILVA, G. C. P., PACHECO, R. C. Molecular survey of Babesia vogeli and Hepatozoon species in dogs from urban area of Midwestern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 1357-1364, 2019.

MANCIANTI, F; PEDONESE, F; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.

MEDKOUR, H., LAIDOUDI, Y., LAFRI, I., DAVOUST, B., MEKROUD, A., BITAM, I., & MEDIANNIKOV, O. Canine vector-borne protozoa: Molecular and serological investigation for Leishmania spp., Trypanosoma spp., Babesia spp., and Hepatozoon

spp. in dogs from Northern Algeria. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 19, p. 100353, 2020.

MORAIS, R. C., GONÇALVES, S. C., COSTA, P. L., SILVA, K. G., SILVA, F. J., SILVA, R. P., BRITO, M. E., BRANDÃO-FILHO, S. P., DANTAS-TORRES, F., & PAIVA-CAVALCANTI, M. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and applied acarology**, v. 59, n. 4, p. 473-481, 2013.

MORGADO, F. N., CAVALCANTI, A. D. S., MIRANDA, L. H. D., O'DWYER, L. H., SILVA, M. R. L. D., MENEZES, R. C., & PORROZZI, R. *Hepatozoon canis* and *Leishmania spp.* coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 450-458, 2016.

OLIVEIRA, T. M., FURUTA, P. I., CARVALHO, D., & MACHADO, R. Z. 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

OROZCO, ANDRÉS MAURICIO ORTEGA. **Detecção molecular de hemoparasitos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa-Viçosa/MG**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

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

RAMOS, R., RAMOS, C., ARAÚJO, F., OLIVEIRA, R., SOUZA, I., PIMENTEL, D., & ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology research**, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, 2010

ROJAS, A., ROJAS, D., MONTENEGRO, V., GUTIÉRREZ, R., YASUR-LANDAU, D., BANETH, G. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 121-128, 2014;

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British medical journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261, 1903

ROURA X, BREITSCHWERDT E, LLORET A, FERRER L, HEGARTY B. Serological evidence of exposure to *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Ehrlichia* species in healthy or *Leishmania infantum*-infected dogs from Barcelona, Spain. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, n. 2, 2005

SILVA, D. A., MADEIRA, M. F., TEIXEIRA, A. C., SOUZA, C. M., & FIGUEIREDO, F. B. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 257-261, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L. & BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

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

SPOLIDORIO MG, TORRES MM, CAMPOS WN, MELO AL, IGARASHI M, AMUDE AM. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 253-255, 2011

SPOLIDORIO, M. G., LABRUNA, M. B., ZAGO, A. M., DONATELE, D. M., CALIARI, K. M., & YOSHINARI, N. H. *H. Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357-361, 2009

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

UENO, T.E.H.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. Ehrlichia canis em cães atendidos no hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal. n. 18, v. 3, p. 57-61, 2009.

YISASCHAR-MEKUZAS Y, JAFFE CL, PASTOR J, CARDOSO L, BANETH G. Identification of Babesia species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. **Veterinary parasitology**, v. 191, n. 3-4, p. 367-373, 2013.