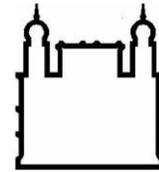




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DA COINFECÇÃO *Leishmania infantum* E *Ehrlichia canis* EM CÃES  
NUMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.**

**RAYSSA MARIA DE ARAUJO CARVALHO**

**Salvador – Bahia  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**ESTUDO DA COINFECÇÃO *Leishmania infantum* E *Ehrlichia canis* EM CÃES  
NUMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.**

**RAYSSA MARIA DE ARAÚJO CARVALHO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aldina Barral

Tese apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Patologia para  
a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia  
2015**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C331e Carvalho, Rayssa Maria de Araujo.  
Estudo da coinfeção *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* em cães numa  
área endêmica para leishmaniose visceral canina / Rayssa Maria de Araujo  
Carvalho. - 2015.  
79 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profª Drª Aldina Barral, Laboratório de Imunoparasitologia.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade  
de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015

1. *Leishmania infantum*. 2. *Ehrlichia canis*. 3. Coinfeção. I. Título.

CDU 616.993.161

Título da Tese: "ESTUDO DA COINFECÇÃO *LEISHMANIA INFANTUM* E *EHRlichia CANIS* EM CÃES NUMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA"

RAYSSA MARIA DE ARAUJO CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



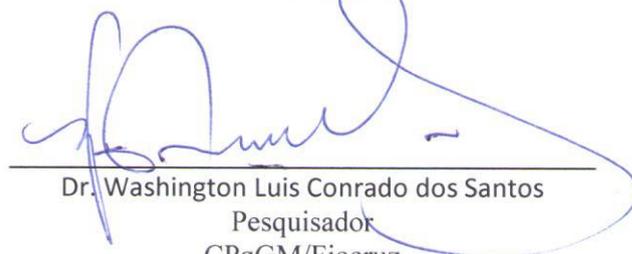
Dra. Ivete Lopes de Mendonça  
Professora Associada  
UFPI



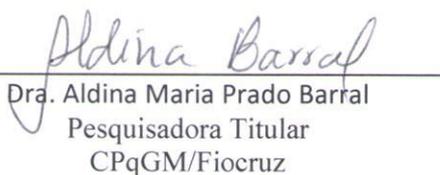
Dr. Luis Fernando Pita Gondim  
Professor Associado,  
UFBA



Dra. Deborah Bittencourt Mothe Fraga  
Pesquisadora  
CPqGM/Fiocruz



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos  
Pesquisador  
CPqGM/Fiocruz



Dra. Aldina Maria Prado Barral  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/Fiocruz

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

CNPq

FIOCRUZ

E ainda que tivesse o dom da profecia,  
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,  
e ainda que tivesse toda a fé,  
de maneira tal que transportasse os montes,  
e não tivesse amor, nada seria

*I Corintios, 13*

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu Pai do Céu, por ter me feito passar pelo que foi preciso para o meu crescimento profissional e pessoal, e por ter colocado pessoas amorosas, para me ajudar nesse processo.

A toda minha família, pela paciência e apoio.

À melhor irmã do mundo, Hannah Carvalho.

Ao meu avô Helder *in memoriam*

## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas do Laboratório de Sanidade Animal- LASAN/UFPI, que contribuíram com sua alegria e disponibilidade.

Ao Joilson e Luciano, que foram meus anjos da guarda, sempre dispostos a ajudar.

À professora Socorro e Dr. Carlos Henrique, por suas dicas e dedicação desde minha iniciação científica.

Ao Departamento de Patologia e Clínicas da Universidade Federal da Bahia, pela doação das células DH82 e cepa de *Ehrlichia canis*, e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Dr. Manoel Barral pela orientação na análise dos dados.

A todos do LIMI/LIP que fizeram minha estadia em Salvador ser inesquecível.

A todos os funcionários da biblioteca do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, especialmente a Ana Fiscina, por suas dicas e agilidade.

A Dra. Aldina, por ter sido muito mais do que uma orientadora, por ter sido mãe e amiga, e me ensinado que todo relacionamento, mesmo profissional, deve ser construído com cumplicidade e compaixão.

CARVALHO, Rayssa Maria de Araujo. Estudo da coinfeção *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* em cães numa área endêmica para leishmaniose visceral canina. 79 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) e a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) são duas doenças, transmitidas por vetores, com ampla distribuição mundial. Os agentes causadores dessas doenças são *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*, respectivamente. Enquanto a EMC é transmitida por carrapatos, principalmente *Rhipicephalus sanguineus*, a *Leishmania* é inoculada no hospedeiro através do inseto-vetor da subfamília Phlebotominae. A maioria dos sinais físicos são comuns às duas enfermidades, o que dificulta o diagnóstico clínico e o tratamento, especialmente em áreas endêmicas. Poucos são os estudos relacionados à coinfeção da erliquiose e leishmaniose caninas no Brasil. No Piauí, particularmente em Teresina, ainda não se tem dados concretos sobre a prevalência dessas afecções. Os sinais físicos variam com a severidade da infecção, a resposta imune do hospedeiro e a presença de coinfeção. Assim, buscamos avaliar cães, independente dos sinais físicos, atendidos no hospital universitário e clínicas particulares da cidade de Teresina, Piauí quanto a frequência de erliquiose e leishmaniose caninas no período de março de 2012 a setembro de 2014, independente de sexo, raça, idade e suspeita clínica, excetuando os cães que vinham apenas para vacinação. Foi realizado exame clínico e colhidas amostras sanguíneas para exame hematimétrico, bioquímico, parasitológico e molecular. Dos 664 cães avaliados para *E. canis*, 22,9% tiveram o DNA amplificado somente para esta bactéria. No caso de *Leishmania infantum*, houve amplificação de DNA em 29,1% dos 664 cães, sendo que, destes, 80 (12,1%) estavam coinfectados com *E. canis*. Anemia e trombocitopenia foram as principais alterações hematológicas observadas em cães infectados tanto com *E. canis*, como com *L. infantum* e coinfectados. As principais alterações bioquímicas nos cães com infecção apenas por *L. infantum*, assim como nos coinfectados, foram hipoglobulinemia e hiperproteinemia. Já nos monoinfectados por *E. canis* a hipoalbuminemia e a uremia foram as principais alterações. Perda de peso, úlceras, apatia, conjuntivite, palidez nas mucosas, alopecia e linfadenomegalia são mais frequentes em cães monoinfectados com *L. infantum* do que nos infectados apenas com *E. canis*. Além disso, os cães coinfectados apresentam uma doença mais severa do que os monoinfectados. Concluímos que a presença da coinfeção por esses agentes infecciosos é endêmica na cidade de Teresina-Piauí e que existe um sinergismo entre as duas doenças. Portanto, destacamos aqui a relevância dos estudos voltados a epidemiologia e melhoria dos testes diagnósticos para uma prevenção e/ou controle mais eficazes dessas doenças.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, coinfeção,

CARVALHO, Rayssa Maria de Araujo. Epidemiological study of *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis* coinfection. 79 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

### ABSTRACT

The Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) and Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) are the two vector-borne diseases with worldwide distribution. The causative agents of these diseases are *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum*, respectively. While CME is transmitted by ticks, especially *Rhipicephalus sanguineus*, *Leishmania* is inoculated into the host through the insect vector of the subfamily *Phlebotominae*. Most clinical signs are common to both conditions, which hinders the clinical diagnosis and treatment, especially in endemic areas. There are few studies related to the coinfection of canine ehrlichiosis and leishmaniasis in Brazil. In Piauí, particularly in Teresina, there is not yet concrete data on the prevalence of these diseases. The clinical signs vary according to the severity of the infection, to the host immune response and to the presence of coinfection. Thus, we sought to evaluate dogs, regardless of clinical signs, seen at university hospital and private clinics in the city of Teresina, Piauí, for the frequency of canine ehrlichiosis and leishmaniasis from March 2012 to September 2014, regardless of sex, race, age and clinical suspicion, except dogs that came just to vaccination purposes. Clinical examination was performed and blood samples for erythrocyte examination, biochemical, and molecular parasitology were collected. From 664 dogs evaluated for *E. canis*, 22, 9% showed amplified DNA, to this bacterium only. Regarding to *Leishmania infantum*, there was DNA amplification in 29, 1% out of the 664 dogs, and, from these, 80 (12, 1%) were coinfecting with *E. canis*. Anemia and thrombocytopenia were major hematologic changes observed in dogs infected with *Leishmania*, *E. canis* and coinfecting dogs. The main biochemical findings in dogs infected by *L. infantum* and coinfecting were hyperalbuminemia, hypoglobulinemia and hyperproteinemia. In those infected only by *E. canis*, hypoalbuminemia and uremia were the main changes. Weight loss, skin lesions, lethargy, conjunctivitis, pale mucous membranes, alopecia and enlarged lymphnodes are more common in dogs with *L. infantum* than in dogs infected only with *E. canis*. In addition, the coinfecting dogs have a more severe disease than the ones with only one infection. We conclude that the presence of coinfection by these infectious agents are endemic in the city of Teresina, Piauí, and that there is a synergism between the two diseases. Therefore, we highlight here the relevance of studies regarding epidemiology and improvement of diagnostic tests for prevention and / or control of the diseases in a more effective way.

**Key words:** *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, coinfection,

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cinética da coinfeção <i>in vitro</i> em células DH82	37
Figura 2	Células DH82 infectadas com <i>L. infantum</i> e <i>E. canis</i> .	38
Figura 3	Coinfecção <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i> .	38
Figura 4	Distribuição, de acordo com o gênero, da infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i>	39
Figura 5	Valores do hematocrito (%) em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i>	40
Figura 6	Número de hemácias( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i> .	41
Figura 7	Polimorfonucleares em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i>	42
Figura 8	Linfócitos em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i> .	43
Figura 9	Monócitos em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i>	44
Figura 10	Plaquetas em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i> .	45
Figura 11	Frequência das alterações hematológicas em cães infectados com <i>L. infantum</i> , <i>E. canis</i> ou coinfectados	46
Figura 12	Frequência de animais com presença de lesões na pele avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i> .	49
Figura 13	Frequência de animais com linfadenopatia avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i> .	50
Figura 14	Frequência de animais com perda de peso avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i> .	51
Figura 15	Frequência de animais com alopecia avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i> .	52
Figura 16	Frequência de animais que apresentavam apatia avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i> .	53
Figura 17	Frequência de animais que apresentavam conjuntivite avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i>	53
Figura 18	Frequência de animais que apresentaram mucosas pálidas avaliados quanto a infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i>	54
Figura 19	Número de sinais físicos em cães infectados com <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Leishmania infantum</i> .	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela I	Frequência da infecção por <i>Leishmania infantum</i> e <i>Ehrlichia canis</i>	38
Tabela II	Distribuição da infecção por <i>E. canis</i> e <i>L. infantum</i> , de acordo com a idade	39
Tabela III	Frequência das alterações bioquímicas em cães infectados com <i>L. infantum</i> , <i>E. canis</i> ou coinfectados.	48
Tabela IV	Frequência de sinais físicos em cães infectados com <i>L. infantum</i> , <i>E. canis</i> ou coinfectados.	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas e Trabalhos
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
EMC	Erliquiose Monocítica Canina
LVC]	Leishmaniose Visceral Canina
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
DCTV	Doença Canina Transmitida por Vetores
HVU-UFPI	Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí
CRIAR	Centro Veterinário Animal
CCA	Centro de Ciências Agrárias
RDW	Distribuição da Largura das Células Vermelhas
LASAN	Laboratório de Sanidade Animal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	18
2.1.1	Ciclo de vida.....	19
2.1.2	Tratamento e controle.....	19
2.1.3	Diagnóstico.....	20
2.1.4	Imunologia .....	21
2.1.5	Patogenia.....	22
2.2	ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA (EMC) .....	23
2.2.1	Ciclo de vida da <i>Ehrlichia canis</i> .....	24
2.2.2	Patogenia.....	24
2.2.3	Diagnóstico.....	25
2.2.4	Tratamento .....	26
2.2.5	Imunologia .....	27
2.2.6	Cultivo in vitro de <i>E.canis</i> .....	28
2.3	COINFECCÃO .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1	ESTUDO <i>IN VITRO</i> .....	32
4.1.2	Cultivo das células DH82 e cinética da infecção por <i>E. canis</i> e <i>L. infantum</i> .....	32
4.2	ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	33
4.2.1	Amostras .....	33
4.2.2	Coleta e preservação das amostras .....	34

4.2.3	<b>Avaliação clínica</b> .....	34
4.2.4	<b>Análises hematológicas e bioquímicas</b> .....	35
4.2.5	<b>Extração de DNA</b> .....	35
4.2.6	<b>Elisa para detecção de anticorpos específicos de <i>Leishmania</i> em cães</b> .....	35
4.2.7	<b>Reação em cadeia pela polimerase (PCR) E Nested-PCR (N-PCR)</b> .....	35
4.2.7.1	Oligonucleotídeos iniciadores .....	35
4.2.7.2	Reação em cadeia de polimerase (PCR) e nested-PCR.....	36
4.3	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	37
4.4	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	38
5.1	<b>CINÉTICA DA INFECÇÃO DE CÉLULAS DH82</b> .....	38
5.2	<b>FREQUÊNCIA DAS INFECÇÕES POR <i>L. INFANTUM</i> E <i>E. CANIS</i>.</b> .....	39
5.3	<b>GÊNERO E IDADE</b> .....	41
5.4	<b>PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS</b> .....	42
5.5	<b>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS</b> .....	48
5.6	<b>SINTOMATOLOGIA CLÍNICA</b> .....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças Caninas Transmitidas por Vetores (DCTV) representam um desafio no que concerne ao diagnóstico. O qual é realizado principalmente por meio de achados laboratoriais e com base nas manifestações clínicas. Entretanto, a maioria dos sinais físicos são similares em diversas doenças infecciosas caninas (CIARAMELLA et al, 1997), o que dificulta o diagnóstico clínico e o tratamento, especialmente em áreas endêmicas para mais de uma enfermidade, ou quando o cão é infectado com mais de um agente patogênico (MANA et al, 2009).

Algumas DCTV, como as causadas por *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*, *Rickettsia spp*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Bartonella spp*, são de importância zoonótica e constituem um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo uma ameaça para os cães e seus proprietários (MCDADE, 1990; UNVER et al, 2001; OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009).

A frequência das doenças caninas transmitidas por vetores vem aumentando no mundo inteiro. As condições para tal aumento envolvem diversos fatores, como viagens com animais de estimação para áreas endêmicas e mudanças climáticas que têm impacto direto nos vetores (abundância, distribuição geográfica e capacidade vetorial) (BEUGNET; MARIÉ, 2009).

Dentre as DCTV, a Erliquiose Monocítica Canina (EMC) e a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) se destacam no Brasil pelo grande número de animais infectados. Além disso, apesar da epidemiologia dessas DCTV se sobreporem em muitas áreas do mundo, uma vez que a atividade do vetor e os períodos de transmissão destes patógenos são similares, o impacto das coinfeções, especialmente no Brasil, ainda é desconhecido (OLIVEIRA et al, 2009; CORTESE et al, 2010; GAUNT et al, 2010; COUTO, 2010)

A LVC e a EMC são causadas por patógenos intracelulares obrigatórios, *L. infantum* e *E. canis*, respectivamente. Entretanto, a *L. infantum* é transmitida por um flebotomíneo, *Lutzomyia longipalpis*, enquanto a *E. canis*, principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (REY, 2001; NICHOLSON et al, 2010). Uma vez que esses parasitas também podem infectar humanos, os cães têm um importante papel na epidemiologia da doença humana (UNVER et al, 2001; ISMAIL; BLOCH; MCBRIDE, 2010; DAY, 2011, SILVA et al, 2014).

A *L. infantum* é um patógeno intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear-fagocitário, afetando principalmente órgãos como medula óssea, baço e o fígado (MAIA et al,

2007; MOMO; JACINTHO; VASCONCELOS, 2014; LIMA.; SILVA; DOS-SANTOS, 2014). O cão é considerado o principal reservatório doméstico da doença (ASHFORD, 2000; COURTENAY et al, 2002, CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005). Os animais, uma vez infectados, podem permanecer em um quadro infeccioso assintomático ou podem apresentar uma doença progressiva (REIS et al, 2006; LIMA; SILVA; DOS-SANTOS, 2014).

A EMC é uma doença multissistêmica que se manifesta pelas formas aguda, subclínica e crônica. Logo, conhecer a frequência dessas afecções e quais manifestações clínicas são importantes para o diagnóstico diferencial entre as mesmas possibilita ao médico veterinário um diagnóstico seguro e precoce, levando a um prognóstico satisfatório. Assim, buscamos avaliar, independente dos sinais físicos, cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí (HVU-UFPI) e clínicas particulares da cidade de Teresina, Piauí, a frequência de erliquiose, leishmaniose canina e coinfeção *Leishmania- Ehrlichia*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

As duas principais espécies causadoras da leishmaniose visceral são a *Leishmania (Leishmania) donovani* e a *Leishmania (Leishmania) infantum*. Elas são responsáveis pela infecção de mais de 400.000 pessoas e morte de outras 40.000 por ano (WHO, 2010; DESJEUX, 2013). A *L. donovani* é encontrada na Eurásia e na África, e afeta principalmente a população pobre, que vive na zona rural do Nordeste Indiano e do leste da África (ALVAR et al, 2012). Atribui-se a maioria dos casos da doença causada pela *L. donovani* a uma infecção antroponótica, de ser humano para ser humano. Em contraste, a infecção por *L. infantum* é zoonótica, não apenas na região mediterrânea, onde provavelmente ela se originou, mas também na América Latina (LUKES, 2007).

Esse protozoário é usualmente transmitido para o hospedeiro vertebrado, através da picada de uma fêmea de flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo (READY, 2013), sendo que a *Lu. longipalpis* é a espécie vetor de maior importância epidemiológica, no Brasil, na transmissão da *L. infantum* (FELICIANGELI, 1999).

A leishmaniose visceral é a zoonose de maior importância epidemiológica no Brasil, uma vez que essa doença sistêmica afeta tanto cães como humanos. O Brasil é, também, o país da América do Sul com maior número de casos humanos e um dos cinco países mais afetados no mundo (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009). De 1995 a 2013, a soroprevalência da LVC em Teresina variou de 1,6% em 1996 a 41% em 2013, com média de 9% (OLIVEIRA, 2014). A doença canina precede a ocorrência de casos humanos, e o cão é considerado o principal reservatório doméstico da doença (HARHAY, 2011; LAURENTI et al, 2013).

Mudanças ambientais tais como a urbanização e o desmatamento estão entre as principais causas de alterações na dinâmica da doença, como, por exemplo, aumento da prevalência e da incidência da doença em humanos, em animais domésticos e silvestres (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; BREARLEY et al, 2012). Além disso, muitas espécies de flebotomíneos parecem ter bastante facilidade para se adaptar a mudanças ambientais drásticas. Outro fator importante é a influência de outros animais domésticos, que também atraem o vetor e

contribuem para o aumento do risco de infecção tanto em cães como em humanos (ALMEIDA et al., 2012).

### **2.1.1 Ciclo de vida**

A forma infectiva da *Leishmania* (promastigota metacíclica) se desenvolve no intestino do vetor, *Lu. longipalpis*. Após ser inoculado no hospedeiro definitivo, o parasita é então fagocitado pelas células do sistema mononuclear fagocitário, onde se transforma na forma amastigota, com a perda do flagelo.

Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos recrutados, eles se multiplicam e causam a lesão primária no sítio de infecção (READY, 2014). A partir daí, o parasita pode ser disseminado via sanguínea ou linfática, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodo, fígado, baço, bem como dos rins e do trato gastrointestinal (ALEXANDER, 1992).

Recentemente, tem-se sugerido que carrapatos, como o *R. sanguineus*, também participam do ciclo da LVC (COUTINHO et al, 2005; DANTAS-TORRES et al, 2010; PAZ et al, 2010; COLOMBO et al, 2011). Campos et al. (2014) observaram que 22,9% dos carrapatos que se alimentaram em cães com Leishmaniose Visceral foram positivos na PCR para *Leishmania spp.* em Teresina-Piauí.

### **2.1.2 Tratamento e controle**

No Brasil, as principais práticas profiláticas para o controle da doença incluem o tratamento sistemático e precoce de casos humanos, além de controle de vetores e eliminação de cães soropositivos (ZANETTE et al., 2014).

O controle efetivo e a eliminação definitiva da LVC na América Latina estão longe de ser uma realidade, uma vez que a *L. infantum* possui um grande reservatório doméstico e um reservatório silvestre substancial. A existência de lacunas no conhecimento, a falta de fiscalização e envolvimento político são, também, entraves ao controle da doença (ROMERO; BOELAERT, 2010).

No Brasil, a formulação mais usada no tratamento da Leishmaniose humana é o antimoniato N-metil glucamina, na dose de 20mg/kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias. Em caso de resistência a esse medicamento, pode-se usar como alternativa o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas

formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato) e os imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF) (BRASIL, 2014; ROAT et al, 2014).

Já o tratamento da LVC ainda é alvo de muita controvérsia, as drogas tradicionalmente empregadas são o antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol e itraconazol. Entretanto, todas têm tido baixa eficácia com remissão temporária dos sinais físicos (BRASIL, 2014). Além disso, há evidências que mesmo cães assintomáticos são capazes de infectar o vetor e permanecer como reservatório da doença (LAURENTI et al, 2013).

Apenas uma vacina encontra-se comercialmente disponível, a Leish-Tec®. Em um estudo observou-se, em 11 meses pós-vacina, que 12.2% (5/41) dos animais vacinados com a Leishmune® e 7.9% (3/38) dos vacinados com Leish-Tec® apresentavam parasitismo por *L. infantum* e taxa de transmissão no xenodiagnóstico de 5.1% (2/39) e 5.4% (2/37), respectivamente ( FERNANDES, 2014).

### 2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico e o tratamento dessas doenças caninas continuam a ser um desafio para os veterinários, uma vez que os sinais físicos são similares e coinfeções com um ou mais agentes são frequentes ou geram sinais clínicos atípicos (MEKUZAS et al, 2009). A confirmação diagnóstica dessas DCTVs inclui histórico de exposição ao vetor, sinais clínicos compatíveis e confirmação laboratorial, sendo suportada por testes citológicos, sorológicos e moleculares.

O diagnóstico da LVC é um dos passos essenciais no controle da doença, inclusive humana, uma vez que o programa de controle da leishmaniose no Brasil envolve a eliminação de cães infectados (TESH, 1995). Esse é geralmente realizado por meio de testes sorológicos, com a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro de animais infectados, juntamente com os dados clínicos e epidemiológicos (REIS et al, 2005).

O ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e o teste imunocromatográfico rápido DPP (*dual path platamorf*) vêm sendo utilizados para controle e triagem da LVC (GRIMALDI et al, 2012; COURA-VITAL et al, 2014; LAURENTI et al, 2014). Apesar de os testes sorológicos terem alta sensibilidade, em áreas endêmicas a sorologia positiva é insuficiente para o diagnóstico (COSTA et al, 1991).

Além disso, estudos mostram que cães assintomáticos podem se restabelecer e desenvolver a doença clínica ou permanecer assintomáticos por anos, até mesmo por toda a vida, sendo que uma alta porcentagem desses cães é soronegativa e, no entanto, apresentam Reação em Cadeia pela Polimerase (PRC) positivo (REIS et al, 2009; COURA-VITAL et al, 2011).

Mendonça et al. (2010) realizou uma pesquisa estudando cães de área endêmica para LVC (Teresina-Piauí) e não endêmica (Vitória-Espirito Santo). Em Teresina, os testes de Imunofluorescência Indireta (RIFI) 1:40, teste de aglutinação direta (DAT™) e teste de aglutinação rápida (FAST™) obtiveram boa sensibilidade. Já os testes RIFI 1:80 e o Ensaio Imunoenzimático com Proteína Recombinante k39 (ICrK39) tiveram desempenho razoável e a PCR de sangue periférico detectou menos de 1/3 dos cães infectados. Na área não endêmica, os resultados da especificidade foram excelentes para o FAST™, DAT™, ICrK39 e PCR de sangue periférico, a RIFI 1:180 apresentou resultado moderado e a menor especificidade foi detectada na RIFI 1:40, mostrando a grande variação nos resultados dos testes em diferentes cenários de transmissão.

O diagnóstico definitivo é baseado na visualização do parasita em amostras provenientes do aspirado do baço, medula óssea e linfonodo, ou, ainda, por material de lesões de pele, corados com Giemsa, ou em secção histopatológicas corados com HE. Outros métodos de visualização direta do parasita incluem o isolamento do parasita em cultura *in vitro* ou inoculação em animais de laboratório (MAIA et al, 2007).

#### **2.1.4 Imunologia**

Na LVC a imunidade protetora está associada à produção de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  (resposta Th1) por células mononucleares do sangue periférico, assim como à citotoxicidade de células T CD8<sup>+</sup>. As citocinas pró-inflamatórias, principalmente o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , ativam macrófagos e estimulam a produção de óxido nítrico, o que resulta na morte dos parasitas intracelulares. Por outro lado, a susceptibilidade à infecção correlaciona-se principalmente com a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , mas também IL-4, IL-5 e IL-13 (resposta Th2). Assim, o balanço de citocinas pró e antiinflamatórias, em conjunto com a patogenicidade da *Leishmania* determinam a susceptibilidade ou resistência à infecção (PINELLI et al, 1995; CORREA et al, 2007; LAGE et al, 2007; MENEZES-SOUZA et al, 2011).

Cães assintomáticos parecem ter um tipo diferente de resposta imune, que é caracterizada por linfócitos T CD4+ e células B CD21+ com alta expressão de IFN- $\gamma$  (REIS et al, 2006; COURA-VITAL et al, 2011; MENEZES-SOUZA et al, 2011).

Em cães soropositivos, tanto assintomáticos como sintomáticos, foi observada uma diminuição de linfócitos T CD5+, T CD4+ e T CD8+, o que indica uma imunossupressão de linfócitos T circulantes que contribui para a infecção e progressão da doença (BOURDOISEAU et al, 1997; REIS et al, 2006; ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; LEAL et al, 2014). Além disso, esses animais apresentaram diminuição de linfócitos B CD21+, o que pode ser correlacionado com o aumento da carga parasitária na medula óssea e à severidade dos sinais clínicos, o que sugere que essa subpopulação de linfócitos B pode ser um bom marcador de suscetibilidade a LVC (BOURDOISEAU et al., 1997; COURA-VITAL et al, 2011; LEAL et al, 2014).

Em contraste, cães assintomáticos soronegativos, porém positivos na PCR, não apresentaram alterações nas populações celulares e não diferem do perfil encontrado em animais sadios (LEAL et al, 2014).

### **2.1.5 Patogenia**

A evolução clínica da LVC envolve claras alterações sorológicas e nos parâmetros bioquímicos e hematológicos que estão diretamente relacionadas ao status clínico da doença (CIARAMELLA et al, 2005). As alterações bioquímicas estão ligadas a resposta imune humoral policlonal, que leva a um aumento das proteínas totais no soro, caracterizado por hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, além da diminuição da razão albumina/globulina (MARZOCHI et al, 1985; CARDOSO; CABRAL, 1988).

Durante o curso da LVC observam-se alterações em vários parâmetros hematológicos, tais como a redução significativa de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, que caracterizaram a anemia grave, especialmente em cães sintomáticos, sendo a anemia normocítica e normocrômica a mais encontrada (MARZOCHI et al, 1985; CARDOSO; CABRAL, 1988). Além da anemia, cães soropositivos apresentam eosinopenia, linfopenia e monocitopenia (REIS et al, 2006; LEAL et al, 2014). Outrossim, a redução da contagem de células brancas do sangue em cães sintomáticos pode ser associada com a disfunção da medula óssea, com o parasitismo intenso causando diminuição da hematopoiese (TROPIA DE ABREU et al., 2011).

Os animais infectados podem permanecer em um quadro infeccioso assintomático ou podem apresentar uma doença progressiva com sinais físicos variados como perda de peso progressiva, linfadenomegalia local ou generalizada, hepatoesplenomegalia, onicogribose e lesões cutâneas, tais como dermatites, ulcerações e alopecia (GONZÁLEZ et al, 1990; FERRER et al, 1991; CIARAMELLA et al, 1997; REIS et al, 2006; LIMA; SILVA; DOS-SANTOS, 2014). Alguns cães também apresentam epistaxe, artrites, hemorragias intestinais, ceratoconjuntivites e uveítes (FERRER et al, 1991). Nos estágios tardios da doença, uma falência renal crônica devido a glomérulo-nefrite imunomediada aparece na maioria dos animais doentes (LEIB et al, 1989).

## 2.2 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA (EMC)

A EMC é uma doença causada pela *Ehrlichia canis*, uma rickettsia, da família Anaplasmataceae (TORRES et al, 2002). Essa bactéria foi descrita pela primeira vez por Donatien & Letosquard (1935), na Argélia. Somente após um surto em cães da Armada Americana, vitimando cerca de 300 cães, a doença foi caracterizada como uma enfermidade canina (HUXSOLL et al, 1970). No Brasil, a *E. canis* foi identificada pela primeira vez em um cão na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais (COSTA et al, 1973).

A *Ehrlichia* é transmitida principalmente pela picada de um carrapato infectado, o *Rhipicephalus sanguineus* (STICH et al, 2008), embora existam alguns relatos de transmissão pelo *Amblyomma americanum* (ANZIANI; EWING; BARKER, 1990), e transmissão experimental bem sucedida por *Dermatocentor variabilis* (JOHNSON et al, 1998). Além disso, esse organismo é comumente transmitido por transfusão sanguínea (REINE, 2004).

Os hospedeiros vertebrados mais comuns da *E.canis* são da família Canídea - cães, coiotes, raposa e chacal (VIDOTTO, 2001). Entretanto, há relatos de infecções em humanos (SILVA et al, 2014) e em gatos (SANTARÉM; LAPOSY; FARIAS, 2005)

Devido à distribuição geográfica do vetor, observa-se uma alta prevalência de Erliquiose em regiões tropicais e subtropicais (ANDEREG; PASSOS, 1999; AGUIAR et al., 2013).

### 2.2.1 Ciclo de vida da *Ehrlichia canis*

O microrganismo é adquirido pelo carrapato durante repasto sanguíneo em um cão infectado. As larvas e ninfas se infectam quando se alimentam no hospedeiro, durante a fase aguda da doença, através da ingestão de leucócitos infectados (SMITH et al, 1976). No carrapato, a bactéria se dissemina nos hemócitos do intestino para a glândula salivar. Nos carrapatos, a bactéria se mantém somente por transmissão transtadial (WOODY; HOSKINS, 1991). Portanto, as larvas de *R. sanguineus* não são importantes na transmissão, porém podem se infectar pelo agente, mantendo a infecção até o estágio adulto (SMITH et al, 1976)

O ciclo da *E. canis* se inicia quando a bactéria é inoculada no cão. Estes agentes são inoculados através das secreções salivares contaminadas durante a picada do carrapato e são fagocitados por células mononucleares. Segundo Santarém (2003), a *Ehrlichia* penetra nessas células sob a forma de corpúsculos elementares, que são as formas individuais do parasita. Uma vez na circulação, entram nos monócitos por fagocitose e se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira. A fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpúsculos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo por divisão binária. As inclusões intracelulares formadas pelas *Ehrlichias* no hospedeiro são denominadas de mórulas (SMITH et al, 1976; TROY; FORRESTER, 1990). Todo o ciclo da infecção, desde a invasão da célula hospedeira pela *Ehrlichia* até a sua eliminação leva, aproximadamente, de 12 a 18 dias (WEISS, 2006).

### 2.2.2 Patogenia

Uma vez infectado com *E. canis*, a doença no cão pode progredir para três fases da doença: aguda, subclínica e crônica (NEER, 1998). A fase aguda dura de 2 a 4 semanas e as principais manifestações clínicas incluem febre, anorexia, perda de peso, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões oftalmológicas, desordens respiratórias, desordens gastrointestinais como vômito e diarreia, além de uma grande variedade de sinais neurológicos (HARRUS et al, 1999; MYLONAKIS, 2014). Desordens hemostáticas como epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica também são comuns (BULLA, 2004). A alteração hematológica mais freqüente é a trombocitopenia, em aproximadamente 84% dos casos. Outros achados são anemia normocítica normocrômica e leucopenia (TROY; FORRESTER, 1990; MOREIRA et al, 2003;

BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009), sendo hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia também comuns (WEN et al, 1995).

Também podem estar presentes elevações das atividades de aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e alaninaminotransferase (ALT) (ALMOSNY, 1998; MOONARMART, 20014;), discreta elevação dos níveis séricos de bilirrubina sem icterícia (ALMOSNY, 1998), além de um aumento nas concentrações séricas de uréia, creatinina e fósforo (TROY, 2006).

A fase subclínica se inicia de 3 a 6 semanas após a infecção com ausência de sintomas clínicos. Achados laboratoriais incluem trombocitopenia (WANER et al., 1997; VILLAESCUSA et al., 2012), leucopenia e anemia não-regenerativa (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). Ainda não são claramente entendidas as condições que levam um cão infectado na fase subclínica a desenvolver sintomas. Entretanto, esse fato pode estar relacionado com a cepa do parasita, stress, coinfeções, localização geográfica e reinfeções (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998; HARRUS et al,1999).

Na fase crônica os sinais físicos são similares aos da fase aguda, porém mais graves (WANER et al., 1995). O envolvimento da medula óssea na fase crônica e a incapacidade do animal de montar uma resposta imune efetiva levam à pancitopenia (HARRUS; BARK; WANER, 1997). É importante salientar, no entanto, que numa infecção natural normalmente essas fases não são bem distinguíveis.

### **2.2.3 Diagnóstico**

A EMC é uma doença complexa que possui diferentes fases clínicas, caracterizadas por diversas expressões, o que torna o diagnóstico um desafio (BANETH et al., 2012). Além disso, a ocorrência de coinfeções com outros patógenos como *Anaplasma platys*, *Babesia canis*, *B. vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Leishmania infantum* pode resultar em diferentes manifestações da doença, dificultando ainda mais o diagnóstico (LITTLE, 2010).

A imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido a técnica mais utilizada para diagnóstico da infecção por *E. canis*, desde que foi desenvolvida ( OLIVEIRA et al, 2000; HARRUS et al, 2002; ORIÁ, 2004). Já existe no mercado um teste rápido qualitativo (SNAP4Dx test, Idexx, USA), que, de acordo com René-Martellet et al. (2015), pode ser utilizado no diagnóstico sorológico da

EMC e tem a vantagem de ser de fácil utilização, rápido e capaz de detectar mais de uma DCTV com uma pequena quantidade de soro. Entretanto, as técnicas sorológicas possuem limitações pois detectam que os cães foram expostos a bactéria, não sendo útil para determinar se há infecção corrente ou para verificar a cura após o tratamento com o antibiótico, além de apresentar uma grande quantidade de falsos positivos em áreas endêmicas (IQBAL; RIKIHISA, 1994).

Outro método de diagnóstico é a visualização da mórula intracitoplasmática em esfregaço de sangue periférico ou medula óssea, entretanto esta técnica é pouco sensível e a mórula só é detectada em 4% dos casos positivos (ELIAS, 1991; HARRUS; WANER, 2011). Embora a pesquisa de mórula seja uma técnica de baixo custo, as mórulas praticamente só são encontradas na fase aguda (ALMOSNY, 1998), o que limita bastante o diagnóstico e pode acarretar um elevado número de falso-negativos.

O PCR tem maior sensibilidade e especificidade para detectar *E. canis*, principalmente em regiões endêmicas ou após o tratamento, e tem sido amplamente utilizado no estudo desta enfermidade (WEN et al., 1997; HARRUS et al, 2004; CORTESE et al, 2006; GAL et al, 2008; SANTAMARIA et al, 2014). O PCR geralmente permite a detecção dos cães infectados com *E. canis* na fase aguda da doença, enquanto a sorologia permite a detecção nas fases tardias como nas fases subclínica, crônica e em animais em recuperação (RENÉ-MARTELLET et al, 2015).

Uma vez que o diagnóstico da EMC pode se tornar demorado e custoso, podendo inclusive prejudicar a eficácia do tratamento, Moonarmart et al. (2014) sugerem que a contagem de plaquetas é um bom preditor de erliquiose monocítica em cães, e que esse dado deve ser utilizado como um teste de triagem antes da pesquisa do parasita. Entretanto deve-se ter atenção no diagnóstico diferencial com outras patologias que também causam trombocitopenia.

#### **2.2.4 Tratamento**

Dentre os protocolos existentes para o tratamento da EMC, o antibiótico de eleição é a doxiciclina, que consiste em um bacteriostático da família das tetraciclina que atua em todos os estágios da doença canina (BRANGER; ROLAIN; RAOULT, 2004; EDDLESTONE et al, 2007; DAVOUST et al, 2013; LAUMMAUNWAI et al, 2014).

O tratamento pode variar de acordo com a fase e o estado em que o animal se encontra, e a dose recomendada pode variar de 5 a 10 mg/kg de peso corporal, duas vezes ao dia, por 30 dias (EDDLESTONE et al, 2007; SCHAEFER et al, 2008; DAVOUST et al, 2013). Em caso de

erliquiose subclínica é sugerido o prolongamento do tratamento por mais de 6 semanas (HARRUS et al, 1998).

Entretanto, alguns cães podem desenvolver intolerância à doxiciclina (RISTIC et al, 1972). Nesses casos, sugere-se utilizar outras tetraciclinas, como a azitromicina (GALVÃO et al, 2009) e cloranfenicol, em cães que não estejam com citopenia (COUTO, 2008). O tratamento com rifamicina, apesar de ser capaz de acelerar a recuperação hematológica, não é capaz de eliminar a *E. canis* durante a infecção aguda (THEODOROU et al., 2013). Até o momento, não existe vacina comercial para a prevenção da EMC, e o controle do carrapato continua a ser o melhor método para prevenção da doença (RUDOLER, 2012).

### 2.2.5 Imunologia

A resposta imune desencadeada pela infecção por *E. canis* parece influenciar a ocorrência dos sinais físicos, os achados laboratoriais e a patogênese da doença. No entanto, os dados sobre a imunopatogênese da EMC em infecções naturais são escassos e controversos (NEER; HARRUS, 2006).

Atualmente acredita-se que a resposta imune celular é a mais importante na proteção contra a EMC, entretanto essa hipótese não tem, ainda, suficiente suporte experimental (HARRUS et al, 1999).

Alguns estudos demonstram que existe predominância de resposta tipo Th1, com produção de citocinas como interferon (IFN)- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (TAJIMA; RIKIHISA, 2005), enquanto outros autores sugerem que na fase aguda de erliquiose canina existe uma predominância de citocinas como interleucina (IL)1- $\beta$  e IL8 e baixa expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (UNVER et al, 2006). Em um estudo realizado *in vitro*, demonstrou-se que o IFN- $\gamma$  tem efeito inibitório na infecção das células por *E. canis* (TAJIMA; WADA, 2013).

O papel da resposta humoral na EMC ainda é pouco entendido. Os linfócitos B parecem estar relacionados com uma resposta protetora, provavelmente mediada pela secreção de diferentes citocinas e pela estimulação de linfócitos T CD4+ *Ehrlichia*-específicos (YAGER et al., 2005; BITSAKTSIS et al., 2007). Entretanto, é também possível que os baixos valores de células B encontrados no sangue periférico em cães com sinais clínicos possam estar associados com a alta concentração desses linfócitos nas células do rim, baço e medula óssea durante as fases aguda e crônica (CODNER et al, 1992; NEER; HARRUS, 2006).

Em cães infectados com *E. canis*, tanto sintomáticos como assintomáticos, observa-se uma resposta humoral significativamente mais elevada, com anticorpos da subclasse IgG2, quando comparados com a resposta de IgG1. Essa diferença pode ser observada tanto durante a fase aguda da infecção como na fase subclínica, além de persistir durante o tratamento com doxiciclina e por um breve período após a cura. Dessa forma, parece não haver relação entre os níveis de anticorpos *E. canis*-IgG com as diferentes fases da doença (HARRUS et al, 2001).

Uma vez que as citocinas IL-4 e IL-10 em humanos e camungongos induzem células B a secretarem IgG1 (STEVENS et al, 1988; BRIERE et al, 1994), enquanto o INF induz a secreção de IgG2 (KAWANO, 1994), e assumindo que as subclasses de IgG representam marcadores para a resposta imune dicotômica Th1/Th2 também em cães, a presença de uma maior quantidade de *E. canis*-IgG2 pode indicar uma produção significativa de citocinas tipo Th1 durante a infecção (HARRUS et al, 2001).

#### **2.2.6 Cultivo in vitro de E.canis**

As células DH82 são macrófagos oriundos de cães com histiocitose maligna. Muito pouco se sabe a respeito dessas células e suas propriedades, entretanto são extensamente utilizadas em pesquisas médicas, principalmente para o estudo de processos cancerígenos e de doenças infecciosas (CHIKAZAWA et al, 2014, HEINRICH et al, 2015). No cultivo *in vitro*, durante as primeiras passagens (1-10), essas células se caracterizam por sua forma arredondada, com pequenas projeções citoplasmáticas, enquanto que após várias passagens elas exibem uma forma mais alongada com projeções citoplasmáticas maiores. A porcentagem de células positivas para CD14-, CD18-, CD45-, e CD80 diminui significativamente com o aumento do número de passagens, enquanto a expressão de CD44, CD86, MHC-I, MHC-II e ICAM-1 permanece inalterada. A linhagem DH82 são células heterogênicas com diferentes propriedades antigênicas e morfológicas (HEINRICH et al, 2015).

Além disso, as células DH82 têm sido amplamente utilizadas no cultivo de *E. canis*, contribuindo para um maior entendimento da doença canina (WELLMAN et al, 1988; CARDOZO et al, 2011; ZWEYGARTH et al., 2013; ALVES et al, 2014). No Brasil, a *E. canis* foi cultivada *in vitro* pela primeira vez utilizando-se essa linhagem, em 2002 (TORRES et al,

2002). Além das células DH82, esses organismos também podem ser utilizados em cultivo celular de monócitos caninos (HEMELT et al, 1980).

### 2.3 COINFECÇÃO

Diferentes patógenos podem, com frequência, parasitar concomitantemente o mesmo hospedeiro e influenciar um ao outro, direta ou indiretamente. Coinfecções dependem não apenas dos agentes patogênicos, mas também das interações complexas entre eles, tanto no hospedeiro definitivo como no intermediário. Essas interações estão relacionadas com o estado imune do hospedeiro, a cepa do parasita e as condições ambientais (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009).

Dessa forma, a patogênese de um parasita específico em um determinado hospedeiro coinfectado com outra espécie de parasita pode ser muito diferente daquela provocada por esse parasita em um hospedeiro monoinfectado. Esse fato possui uma série de implicações nos aspectos epidemiológicos e clínicos da parasitologia humana e veterinária (COX, 2001).

São raros os estudos sobre coinfecção entre *E. canis* e *L. infantum*, embora seja uma suspeita frequente entre veterinários em áreas de clima favorável, como é o caso de Teresina, Piauí, e de praticamente todo o nordeste do Brasil.

Além disso, tanto a *E. canis* como a *L. infantum* se disseminam da pele para o baço, fígado e medula óssea, ativando o sistema imune do hospedeiro, induzindo um leque de respostas clínicas e imunopatológicas, que variam desde a infecção assintomática até a doença crônica, que pode culminar com a morte do animal (ANDRADE et al, 2014).

Em um estudo longitudinal realizado com cães naturalmente infectados com *L. infantum*, observou-se que há um aumento na frequência e na severidade da sintomatologia clínica em animais coinfectados com *E. canis*. Outro achado importante no acompanhamento destes cães é que a infecção por *E. canis* foi anterior à infecção por *L. infantum* na maioria dos animais, o que sugere que a erliquiose pode contribuir para o aumento da infecção por *Leishmania* (MEKUZAS et al, 2009).

Em animais coinfectados por *L. infantum* e *E. canis* é observada uma redução da agregação plaquetária, além de um aumento no tempo de ativação parcial da tromboplastina e diminuição da razão albumina/globulina (CORTESE et al, 2006). Outro estudo, utilizando 131 cães, a prevalência de coinfecção entre *L. infantum* e *E. canis* foi de apenas 3%, sendo que a

principal alteração hematológica encontrada foi a diminuição do número de plaquetas (COUTO, 2010). Em contrapartida, Paulan et al. (2013), ao analisarem o soro de 93 cães, em Ilha Solteira-São Paulo, encontraram uma prevalência de 27% de coinfeção *L. infantum-E. canis*. Em Teresina, Piauí, essa taxa foi de 6,3% em 270 animais estudados (SILVA et al, 2010).

Andrade et al.(2014), encontraram duas vezes mais parasitas de *L. infantum* na pele de animais coinfectados com *E. canis* do que em animais monoinfectados, o que torna esses animais mais infectivos para o vetor. Além disso, o autor relata que a saúde dos cães coinfectados estava severamente comprometida, com altos níveis de proteína plasmática total, globulinas, fosfatase alcalina, creatina, além de anemia acentuada. Essa diferença é provavelmente devido ao sinergismo entre os dois agentes infecciosos que infectam fagócitos mononucleares, resultando na depressão do sistema imune e favorecendo a replicação da *Leishmania* (MEKUZAS et al, 2009).

De fato, a *E. canis* provoca uma redução nos receptores do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (HARRUS et al, 2003), o que poderia, eventualmente, exacerbar a evolução clínica da LVC e, assim, aumentar a carga parasitária. Por outro lado, a infecção por *L. infantum* também pode prejudicar a resposta imune humoral e celular do hospedeiro e favorecer o estabelecimento ou reativação de uma infecção por *E. canis* pré-existente (BARBIERI et al., 2006).

Existem poucos dados na literatura sobre o impacto da coinfeção no tratamento destas enfermidades, entretanto parece haver uma diminuição na eficácia destes tratamentos, tanto na remissão dos sinais físicos como na redução das alterações hematológicas, na coinfeção (CORTESE et al, 2009; TOMASI et al, 2013).

### 3 OBJETIVOS

1. Estudar a cinética da coinfeção *in vitro*.
2. Estimar a frequência da coinfeção *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* nos animais de Teresina/Piauí
3. Correlacionar a presença da coinfeção com a severidade dos sinais físicos, alterações hematológicas e bioquímicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTUDO *IN VITRO*

#### 4.1.2 Cultivo das células DH82 e cinética da infecção por *E. canis* e *L. Infantum*

As células DH82 ( $10^7$  células/mL) foram cultivadas em garrafas para cultivo de 25cm<sup>2</sup>, incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, em meio Dulbecco modificado (DMEM) (D6046-500ML SIGMA) com 10% de soro de bezerro (SH30072.03 Hyclone). Conforme o seguinte protocolo:

As alíquotas contendo as células DH82 foram retiradas do nitrogênio líquido e mantidas em gelo seco por aproximadamente 2 horas. A seguir, as células foram colocadas em banho-maria a 37°C por 5 minutos e transferidas para tubo de 15 mililitros (mL) contendo 10 mL de meio DMEM completo. Seguiu-se uma centrifugação de 10 minutos a 200g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 5 mL de DMEM completo. Por fim, as células foram transferidas para a garrafa de cultura, contendo 1mL de meio, e incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, descartou-se 5 mL do meio contendo as células DH82 da garrafa de cultivo e adicionou-se 5 mL de meio DMEM completo novo e observou-se a viabilidade celular em microscópio óptico. A cada 2 dias foram adicionados 2 mL de meio completo.

A cepa de *E. canis* foi doada pelo Departamento de Patologia e Clínica da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia e mantida em células de linhagem DH82. Essas células infectadas com *E. canis* foram descongeladas seguindo o mesmo protocolo utilizado para descongelamento de DH82 não infectadas, e transferidas para uma placa de 24 poços, com lamínulas, e a monocamada de células DH82 já formada. A infecção ( $10^7$  células infectadas/mL) foi observada nos seguintes pontos pós infecção: 4horas; 20 horas; 28 horas; 40horas; 48 horas; 5 dias; 8 dias; 12 dias; 13 dias e 18 dias.

Para infecção com *L. infantum*, utilizou-se a cepa (MHOM/BR00/Ba-262) isolada originalmente de um cão com Leishmaniose visceral, e mantida, em hamsters. As formas amastigotas foram recuperadas de baços de hamsters e convertidas em promastigotas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO), suplementado com soro fetal bovino 20% (FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Utah, USA) e 100mg/mL de gentamicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). As formas promastigotas foram mantidas a 25°C, por no máximo quatro passagens.

Ao atingir a fase estacionária, centrifugou-se o meio contendo as formas promastigotas, a 200 g por 30 minutos, a seguir o sobrenadante foi transferido para um tubo e centrifugado a g por 30 minutos. Ressuspendeu-se o pellet em 0,8mL do meio DMEM completo. A contagem das *Leishmanias* foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para  $10^8$  parasitas/mL. Essa solução foi utilizada para infecção ou coinfeção *Leishmania-Erlichia* de células DH82, em placa de 24 poços, nos mesmos pontos utilizados durante a infecção por *E. canis*.

Foram realizados cinco experimentos para cada grupo (somente *L. infantum*, somente *E. canis* e coinfectados), nos diferentes pontos. As lamínulas foram coradas com panótipo e observadas em microscópio óptico. A contagem das células infectadas, foi realizada por dois observadores independentes, foi utilizada quatro campos por lâmina, num total de 100 células contadas por campo.

## 4.2 ESTUDO *IN VIVO*

### 4.2.1 Amostras

Foram utilizados 664 cães, para estimar a frequência das doenças estudadas. Os animais são provenientes do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí (HVU-UFPI) e de clínicas particulares da cidade de Teresina, PI, no período de março de 2012 a setembro de 2014, independente de sexo, raça, idade e suspeita clínica, excluindo os cães que vinham apenas para vacinação. Desses animais, 352 foram avaliados clinicamente, quanto à presença de sinais físicos.

Critérios de inclusão:

- Cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí e em clínicas particulares de Teresina.

Critérios de Exclusão:

- Cães que foram atendidos (HVU/UFPI ou clinicas particulares) apenas para vacinação.
- Cães positivos no exame sorológico, porém negativos nos testes parasitológicos ( cultura, exame direto e PCR)

#### 4.2.2 Coleta e preservação das amostras

De cada animal foram colhidas três amostras sanguíneas, por venopunção jugular, duas em tubos a vácuo de polipropileno com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), uma para análise hematológica e outra armazenada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA e realização da Reação em Cadeia de Polimerase (nPCR) para a detecção de *E. canis*. A terceira amostra era colhida em tubos à vácuo sem anticoagulante, para realização das análises bioquímicas. O soro foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização da sorologia para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

Além disso, foram colhidos aspirado de medula óssea e linfonodo dos cães para a realização da PCR para detecção de *L. infantum*, e para o exame parasitológico através da visualização direta do parasita, na cultura (NNN enriquecido com Schneider), ou em esfregaço de medula óssea corado com Giemsa. As culturas de linfonodo poplíteo e medula óssea foram observadas a cada três dias no período de um mês.

#### 4.2.3 Avaliação Física

Os cães foram submetidos a exame clínico detalhado e os dados referentes a procedência, sexo, idade e todos os sinais físicos observados foram descritos em ficha clínica. Os cães com doença mais severa apresentaram até 12 sinais físicos e os cães saudáveis não apresentaram nenhuma alteração física. Dessa forma, os animais receberam escore de acordo com a quantidade de sinais físicos, sendo que receberam escore zero aqueles que não tiveram alterações clínicas, e escore 12 os animais com doze alterações clínicas. Os sinais físicos observados nos animais foram: lesões de pele, alopecia, apatia, esplenomegalia, conjuntivite, uveíte, palidez das mucosas, febre, hepatomegalia, perda de peso, diarreia, onicogribose, epistaxe, uveíte, emagrecimento, mucosas pálidas, vômitos, incordenação motora, blefarite, hiperqueratose, seborreia seca e paresia do trem posterior,

#### **4.2.4 Análises hematológicas e bioquímicas**

As análises hematológicas e as bioquímicas foram realizadas no Centro Veterinário Animal (CRIAR) e no Laboratório de Patologia Clínica do HVU-UFPI, respectivamente. Para o hemograma utilizou-se a técnica automatizada em equipamento Vet ABC, e a contagem diferencial de leucócitos realizada a partir da observação de esfregaço sanguíneo corado com método de May-Grunwald-Giemsa. As dosagens bioquímicas para determinação das concentrações séricas de TGP/ALT, uréia, creatinina, proteína total, albumina e globulina foram realizadas utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), conforme recomendações do fabricante.

#### **4.2.5 Extração de DNA**

Para extração de DNA das amostras, utilizou-se o kit QIAamp® DNA Mini Kit (cat n.51306), seguindo as recomendações do fabricante, etapa realizada no Setor de Doenças Parasitárias no Laboratório de Sanidade Animal LASAN da UFPI.

#### **4.2.6 Elisa para detecção de anticorpos específicos de *Leishmania* em cães**

Para o diagnóstico sorológico utilizou-se o kit EIE (Ensaio Imunoenzimático) da BIO-MANGUINHOS (Instituto de Tecnológica em Imunobiológicos), de acordo com a recomendação do fabricante.

#### **4.2.7 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) E Nested-PCR (N-PCR)**

##### **4.2.7.1 Oligonucleotídeos iniciadores**

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para a realização do nested PCR. As seqüências estavam de acordo com Wen et al. (1997). Para detecção de *E. canis*, as seqüências utilizadas na primeira fase da reação (PCR) foram “EOH sense” 5’AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC3’ e o “EOH antisense”

5'CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 3' e para a segunda fase da reação (nested PCR), o “ECA sense” 5' CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA 3' e o “ECA antisense” 5' TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT 3'.

Para detecção de *Leishmania* a PCR foi realizada tendo como alvo uma região conservada de DNA de cinetoplasto do gênero *Leishmania*. Para tal, foram utilizados os iniciadores: 150 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3' e 152 5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' (DEGRAVE, 1994)

#### 4.2.7.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e nested-PCR

A reação de PCR para detecção de *Leishmania* foi realizada em um volume final de 25 µL composta de: 22,5µL de PCR SuperMix (Cat. No. 10572-014), 1µL de cada iniciador (10pmol) e 2,5µL da amostra de DNA extraído. A amplificação das amostras aconteceu nas seguintes condições térmicas: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto, ligação dos iniciadores a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Já para a detecção de *E. canis* foram realizadas duas reações de PCR(NESTED-PCR) com volume total de 25µL, uma mistura de 0,625U de enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA), 1,5mM MgCL<sub>2</sub>, 1x Taq buffer, 0,2mM de dNTP (Invitrogen®, EUA), 200 nM de primers e 15,05ul de água Milli Q autoclavada por reação. A primeira amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, posteriormente uma seqüência de 40 ciclos: desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 65°C por cinquenta segundos e a extensão dos primers a 72°C por quarenta e cinco segundos e, um ciclo final de cinco minutos a 72°C. Já a segunda amplificação foi realizada com os seguintes passos: 94°C por cinco minutos, seguido de 3 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por 45 segundos, e por fim, 32 ciclos de 92°C por um minuto, 55°C por 60 segundos, 72°C por 45 minutos e uma extensão final de 5 minutos por 72°C. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador automático (Bioer Gene pro®).

Os produtos obtidos da amplificação da PCR para detecção de *E. canis* e de *L. infantum* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e examinados comparativamente com marcadores de DNA de 100 pares de bases

(bp). Foram considerados positivos para *E. canis* os produtos de PCR com tamanho de tamanho aproximado de 390 pares de bases (pb) e para *Leishmania* os de 120 pb. As leituras foram realizadas com transluminador UV (BioAgency) e fotografadas em fotodocumentador (Bio-Imaging Systems) no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Patologia Animal CCA/UFPI.

Foi considerado positivo para *Leishmania infantum*, o cão que possuía pelo menos um dos testes parasitológicos positivos (PCR, cultura com NNN ou esfregaço medular). Em relação a *E. canis*, o PCR foi o único teste utilizado para o diagnóstico.

Após os testes sorológicos e parasitológicos os animais foram divididos em quatro grupos:

1. Outras patologias: animais sem infecção por *E. canis* ou *L. infantum*.
2. *L. infantum*: Animais com infecção por *L. infantum* e parasitologicamente negativos para *E. canis*.
3. *E. canis*: cães com infecção por *E. canis*, porém sorologicamente e parasitologicamente negativos para *L. infantum*.
4. Coinfectados: cães com infecção para *L. infantum* e *E. canis*.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizou-se ANOVA. O teste do Qui-quadrado foi calculado para avaliação da sintomatologia física entre os grupos, com intervalo de confiança de 95%. Para análise da coinfeção, por PCR, utilizou-se o teste de Fisher. Todas as análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA).

O cálculo amostral foi realizado, considerando um poder de 99% e um Cohen's d de 0.05, levando em conta que existem cerca de 400.000 cães no Município de Teresina-PI, e que a prevalência da leishmaniose visceral canina é de 41% na cidade, de acordo com os dados do Centro de Zoonoses de Teresina. O tamanho calculado da amostra foi de 296 animais.

#### 4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal CEEA/UFPI – Nº 022/13.

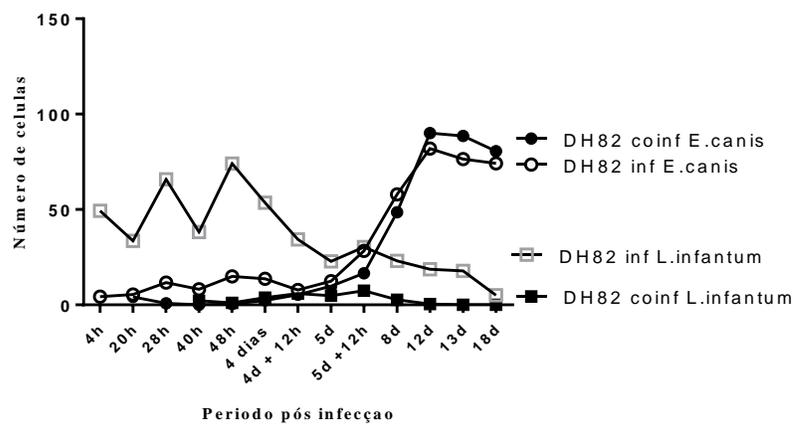
### 5 RESULTADOS

#### 5.1 CINÉTICA DA INFECÇÃO DE CÉLULAS DH82

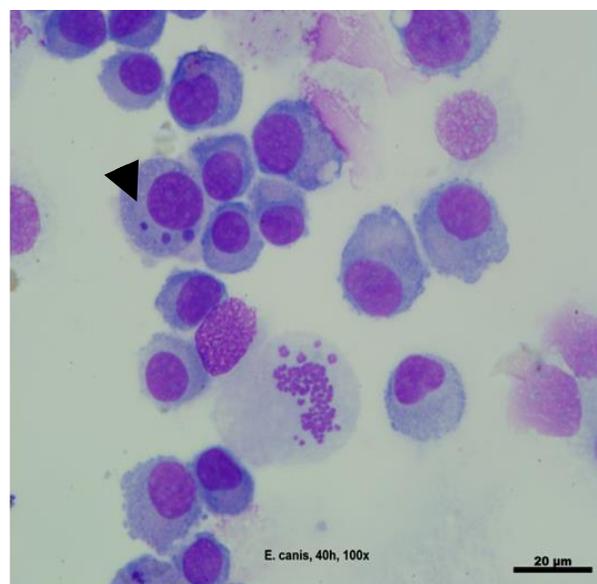
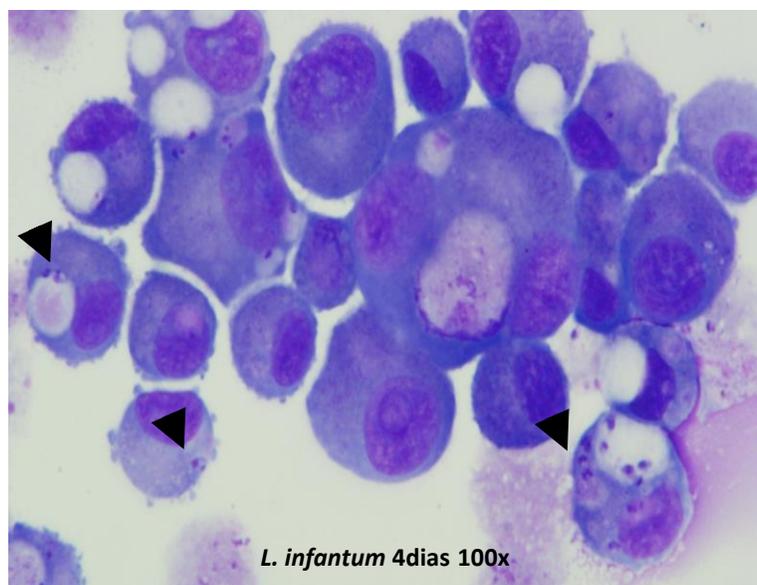
Quando as células DH82 foram infectadas com *Leishmania*, observamos que do primeiro ponto (4 horas) até 48 horas ocorre um aumento na porcentagem de células infectadas, que varia de 50% a 65%. A partir daí, a taxa de infectividade começa a decair até que, finalmente, no décimo oitavo dia não se observa mais parasitismo nas células.

Ao serem infectadas somente por *E. canis*, após 4 horas de infecção, observou-se que 20% das células estavam infectadas. Essa infecção aumentou com o passar do tempo, até que no dia 18 pós infecção 90% das células estavam infectadas com a bactéria.

A coinfeção resultou em uma quantidade menor de células parasitadas por *L. infantum* nas primeiras horas de infecção. A partir do quinto dia da infecção por *L. infantum* ocorre uma diminuição progressiva das amastigotas, mesmo na monoinfecção, até não ser mais possível visualizar as formas amastigotas a partir do 12º dia. Não houve diferença na cinética da infecção por *E. canis*, quando comparamos a monoinfecção com a coinfeção



**Figura 1.** Cinética da coinfeção *in vitro* em células DH82.

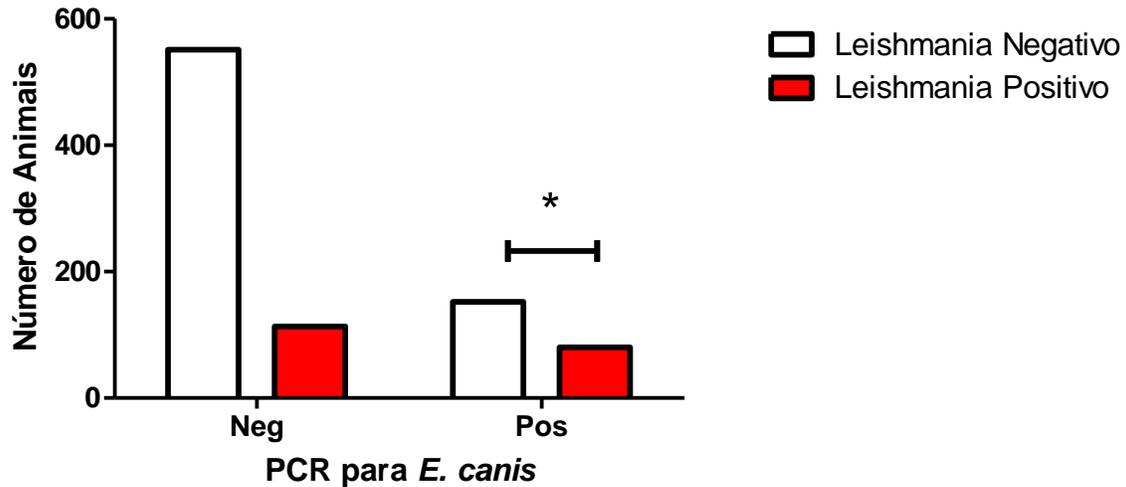


**Figura 2.** Células DH82 infectadas com *L. infantum* e *E. canis*.

## 5.2 FREQUÊNCIA DAS INFECÇÕES POR *L. INFANTUM* E *E. CANIS*.

Tabela I. Frequência da infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*

Infeção	Frequência (PCR)
<i>L. infantum</i>	17% (113/664)
<i>E. canis</i>	22,9% (152/664)
Coinfecção	12,1% (80/664)



**Figura 3. Coinfecção *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*.** Foi realizado PCR para detecção de *Leishmania infantum* e nested PCR para detecção de *Ehrlichia canis*. Teste Fisher  $p < 0,001$

Para detecção da infecção por *Leishmania* utilizamos a reação em cadeia pela polimerase, o DNA foi amplificado em 29,1% dos 664 cães testados, destes 17% estavam monoinfectados e 12,1% também estavam infectados por *E. canis*. Já a bactéria, *E. canis*, foi detectada em 35% das amostras pela técnica de nested PCR, sendo 22,9% monoinfectados. A coinfectação foi detectada em 12,1% (80) desses cães, ou seja, houve amplificação tanto para *L. infantum* como para *E. canis*. (Tabela I).

Também realizamos o teste sorológico ELISA para *Leishmania*, nos 644 cães, e encontramos uma frequência de 24% (160 animais).

## 5.3 GÊNERO E IDADE

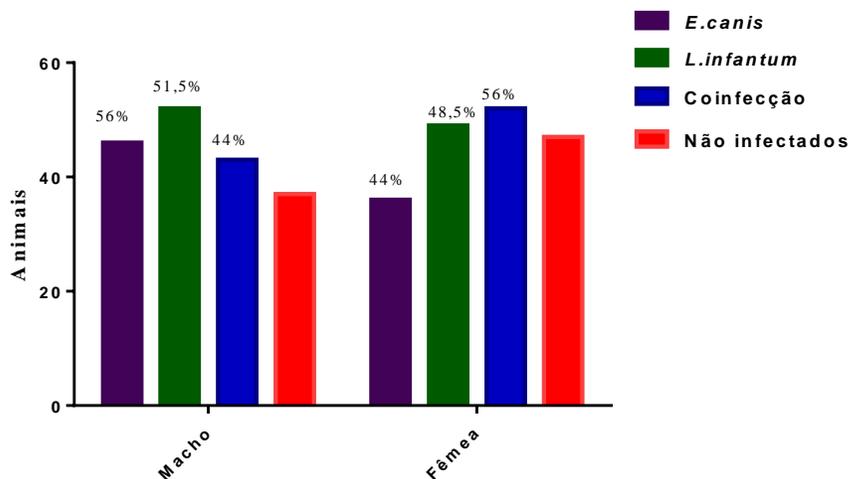


Figura 4. Distribuição, de acordo com o gênero, da infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74.

Tabela II. Distribuição da infecção por *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*, de acordo com a idade

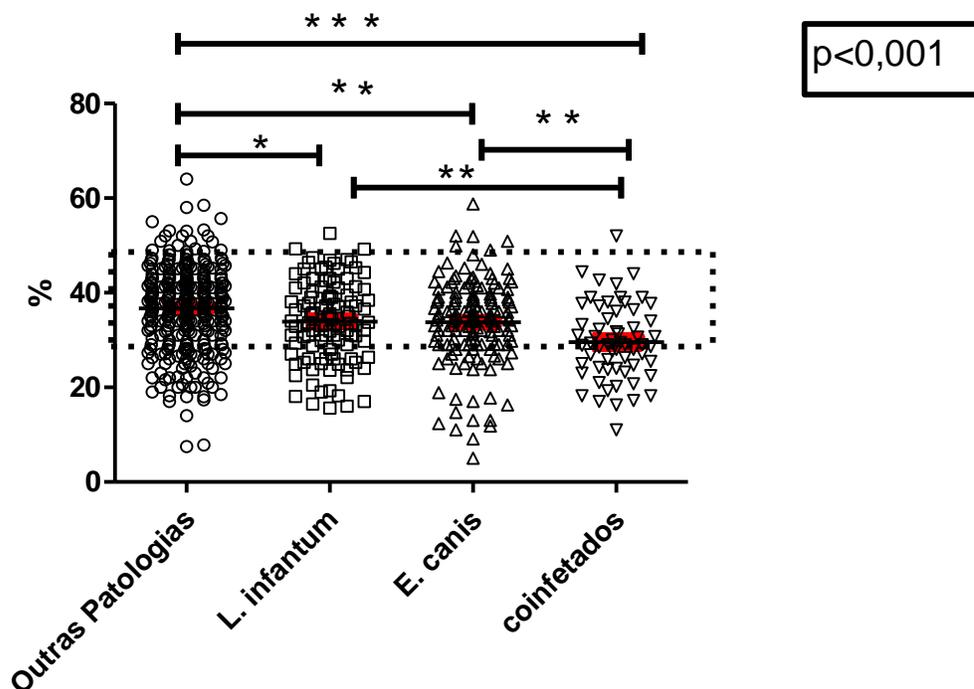
IDADE	<i>E. canis</i> (n=88)	<i>L. infantum</i> (n=101)	COINFECTADO (n=89)	NÃO INFECTADO (n=74)
< 1 ANO	34%	28,7%	30,2%	39,2%
1-5 ANOS	49%	45,6%	48,5%	41,9%
>5 ANOS	17%	25,7%	21,3%	18,9%

Nos cães com monoinfecção por *L. infantum*, 51,5% cães eram machos e 48,5% fêmeas. Os animais acometidos por essa enfermidade tinham principalmente entre 12 meses e 5 anos (49%), e menos de 1 ano (34%) (Tabela II). Entre os animais infectados apenas com *E. canis*,

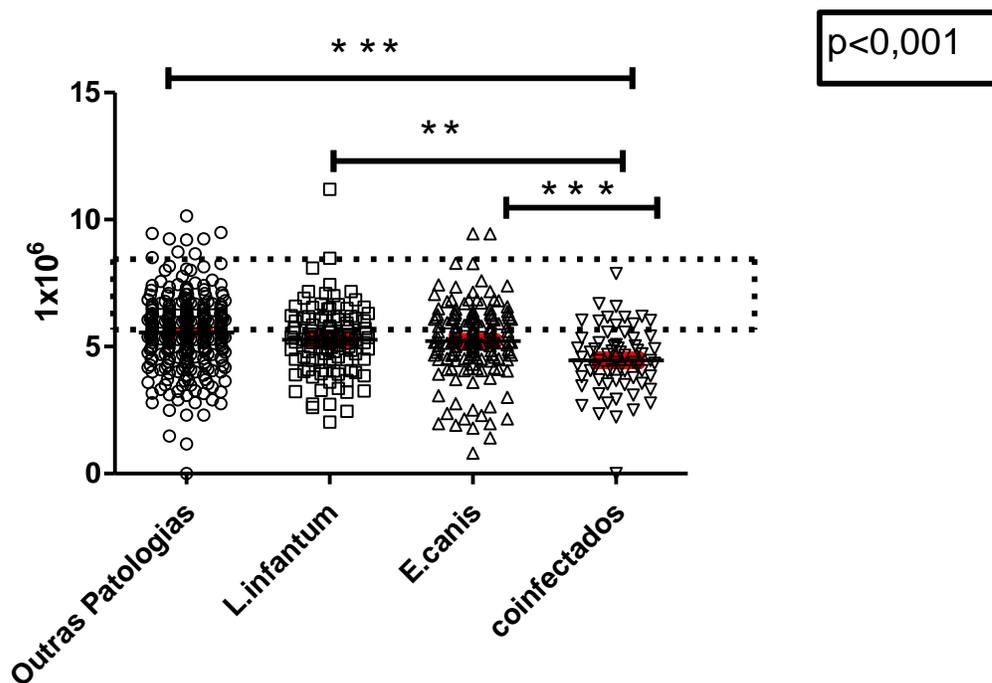
56%, eram machos e 44% fêmeas. A maioria -49%- encontrava-se na faixa etária entre 1 e 5 anos no momento da avaliação clínica. Em cães coinfectados, diferentemente dos 48,5% dos animais tinham entre um e cinco anos. Entretanto, considerando o total de positivos na PCR, não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre nenhuma dessas variáveis e a positividade para *E. canis* e *L. infantum*.

#### 5.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Ao analisar o hematócrito dos cães estudados, encontrou-se diferença significativa ( $p<0,0001$ ) entre o grupo de cães negativos para as duas infecções e os outros três grupos estudados. Além disso, os cães infectados somente com *L. infantum* ou somente com *E. canis* tiveram valores no hematócrito significativamente maiores do que aqueles que estavam coinfectados (figura 5). Valores significativamente menores de hemácias foram observados em cães coinfectados quando comparados com o grupo de animais monoinfectado tanto com *L. infantum* como com *E. canis* (figura 6).

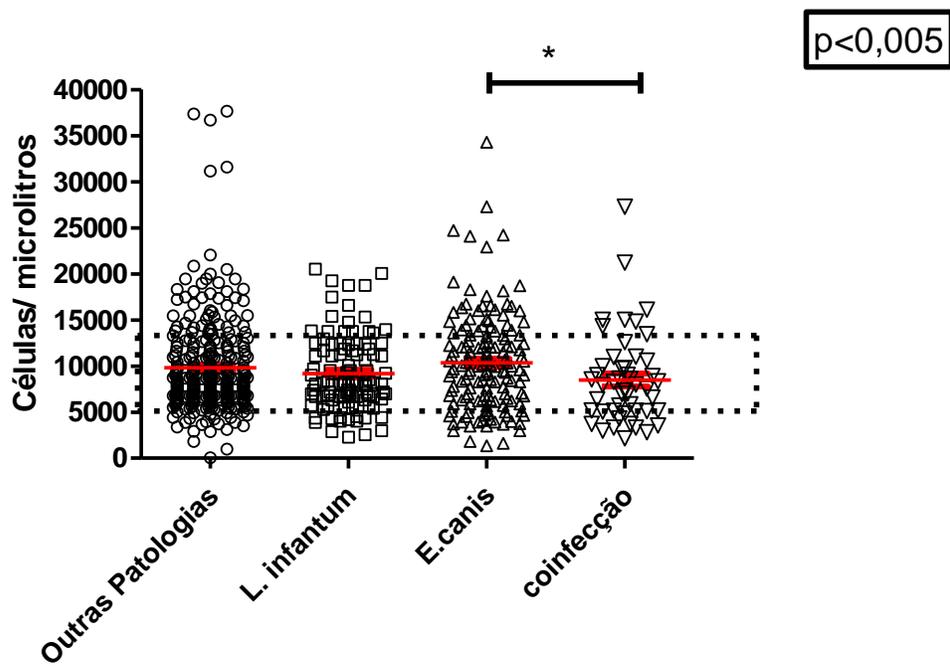


**Figura 5.** Valores do hematócrito (%) em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. O teste ANOVA foi utilizado para análise dos dados ( $p>0,0001$ ).

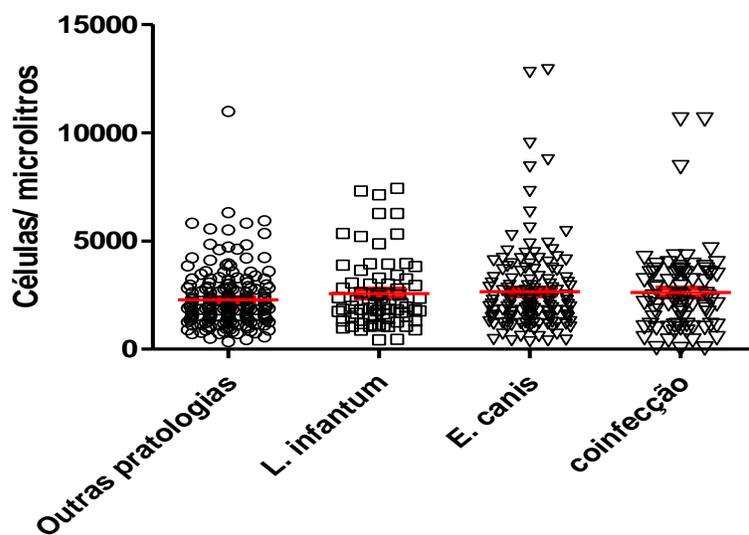


**Figura 6.** Número de hemácias( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. O teste ANOVA foi utilizado para análise dos dados ( $p > 0,0001$ ).

Com relação ao número de PMN (polimorfonucleares) nos diferentes grupos estudados, observou-se que os animais infectados apenas com *E. canis* apresentaram valores significativamente maiores que os animais com coinfecção *Leishmania-Ehrlichia* (figura 7). Não houve diferença entre os grupos em relação ao número de linfócitos (figura 8).

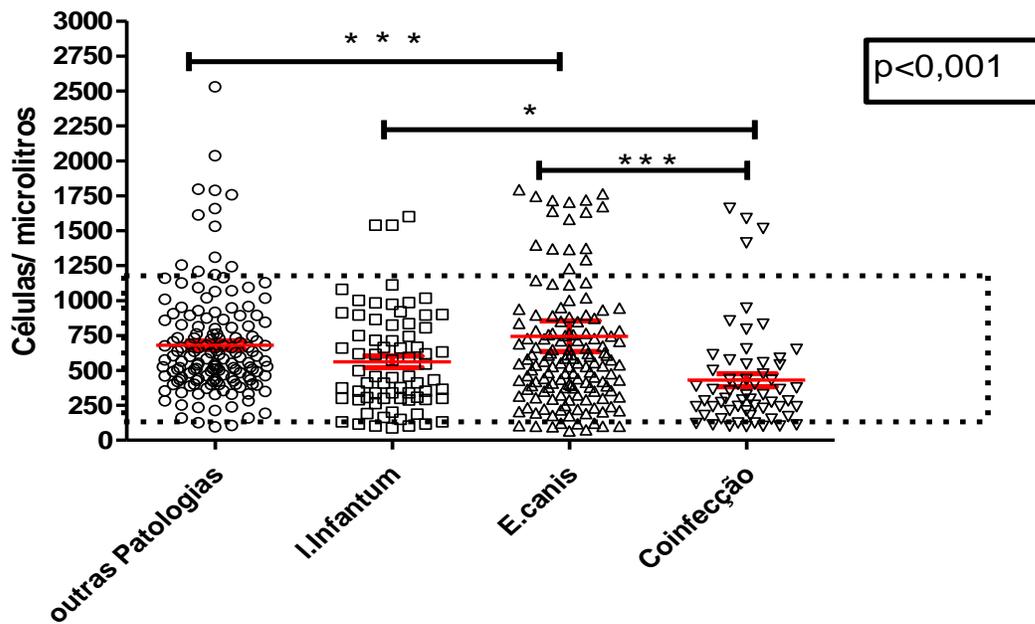


**Figura 7.** Polimorfonucleares em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. O teste ANOVA foi utilizado para análise dos dados ( $p > 0,0001$ ).

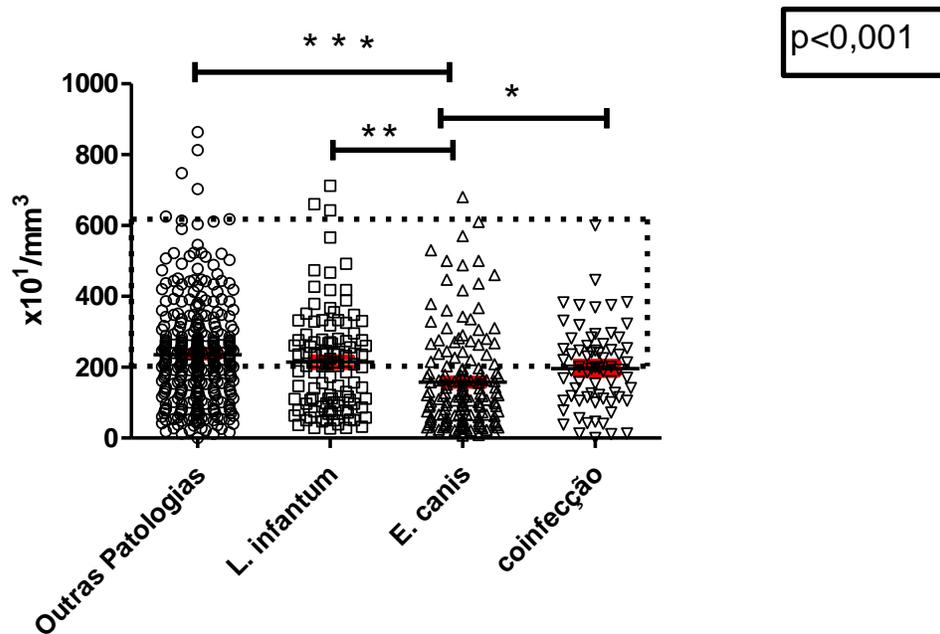


**Figura 8.** Linfócitos em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. O teste ANOVA foi utilizado para análise dos dados.

O número de monócitos nos cães monoinfectados, seja com *L. infantum* ou com *E. canis*, foi significativamente maior do que naqueles coinfectados (figura 9). O grupo de animais sem infecção apresentou maior número de plaquetas dentre todos os grupos, sendo essa diferença expressiva estatisticamente em relação ao grupo monoinfectado com *E. canis*. Além disso, foi observado número significativamente maior de plaquetas nos cães infectados com *L. infantum* (monoinfectados ou coinfectados) quando comparados com os infectados apenas com *E. canis* (figura 10).



**Figura 9.** Monócitos em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. O teste ANOVA foi utilizado para análise dos dados ( $p > 0,0001$ )

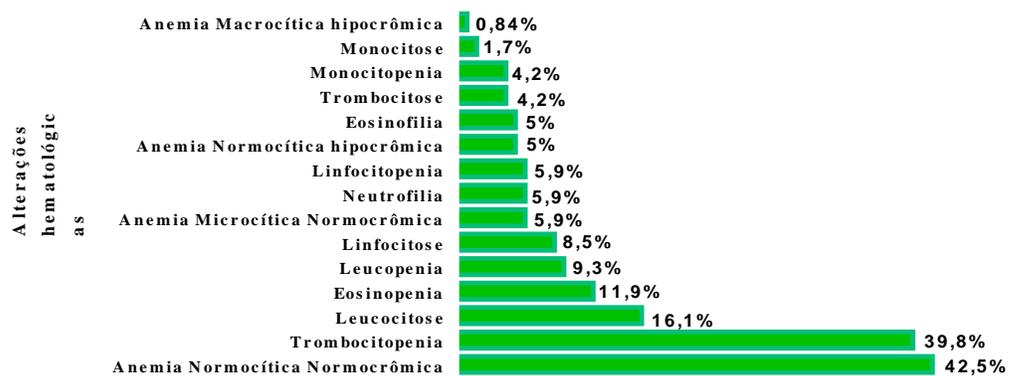


**Figura 10.** Plaquetas em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. O teste ANOVA foi utilizado para análise dos dados ( $p > 0,0001$ ).

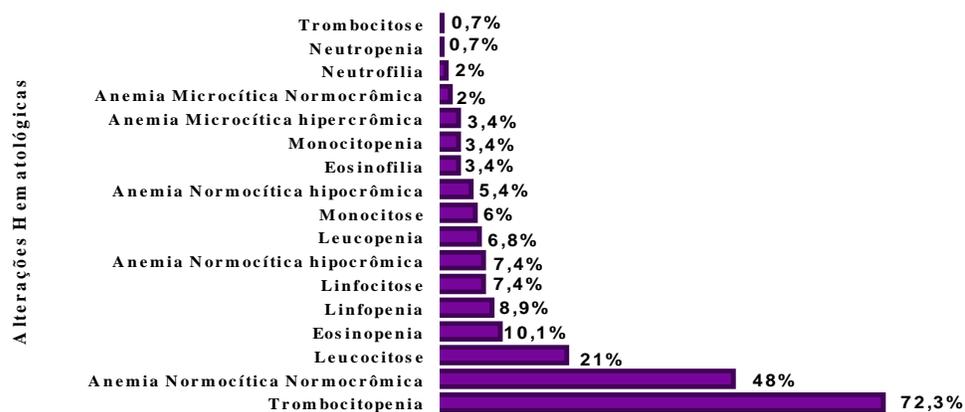
Nos animais positivos apenas para *L. infantum* (113 cães) as alterações hematológicas foram: anemia normocítica normocrômica em 42,5% dos cães, trombocitopenia em 39,8%, leucocitose em 16,1%, eosinopenia em 11,9%, dentre outras alterações em menor quantidade.

Nos cães infectados somente por *E. canis*, os principais achados hematológicos foram: trombocitopenia em 72,3%, anemia em 66,2%, sendo principalmente entre normocítica normocrômica em 48% dos cães e Normocítica Hipocrômica em 7,4%. Ocorreu leucocitose em 21% dos animais, e eosinopenia em 10,1% (Figura10).

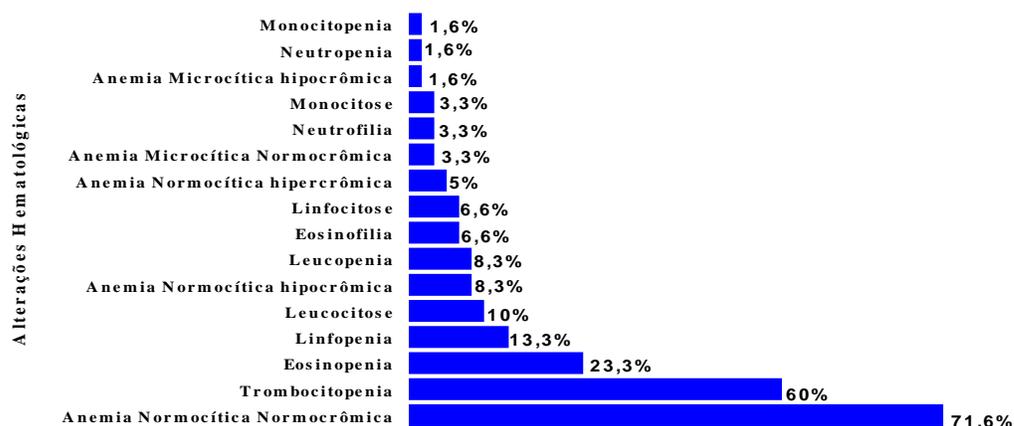
Nos cães coinfectados as principais alterações hematológicas foram: anemia Normocítica Normocrômica (71,6%), trombocitopenia (60%), eosinopenia (23,3%) e linfopenia (13,3%).



Frequência das alterações hematológicas em cães infectados com *L. infantum*



Frequência das alterações hematológicas em cães infectados com *E. canis*



Frequência das alterações hematológicas em cães coinfectados

Figura 11. Frequência das alterações hematológicas em cães infectados com *L. infantum*, *E. canis* ou coinfectados.

## 5.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As principais alterações bioquímicas nos 113 cães com infecção apenas por *L. infantum* foram hiperalbuminemia em 65,5%, hipoglobulinemia em 58,6%, e hiperproteïnemia em 39,6%. Já nos 152 animais monoinfectados por *E. canis* a hipoalbuminemia e a uremia foram as principais alterações encontradas, com 22,4% e 17,3% , respectivamente (Tabela III).

Dentre os 80 cães coinfectados, 43,1% apresentaram hiperalbuminemia, 38% hipoglobulinemia, e 22,4% hiperproteïnemia. Não foi observada nenhuma diferença estatística quando comparamos os grupos mono e coinfectados quanto às alterações bioquímicas.

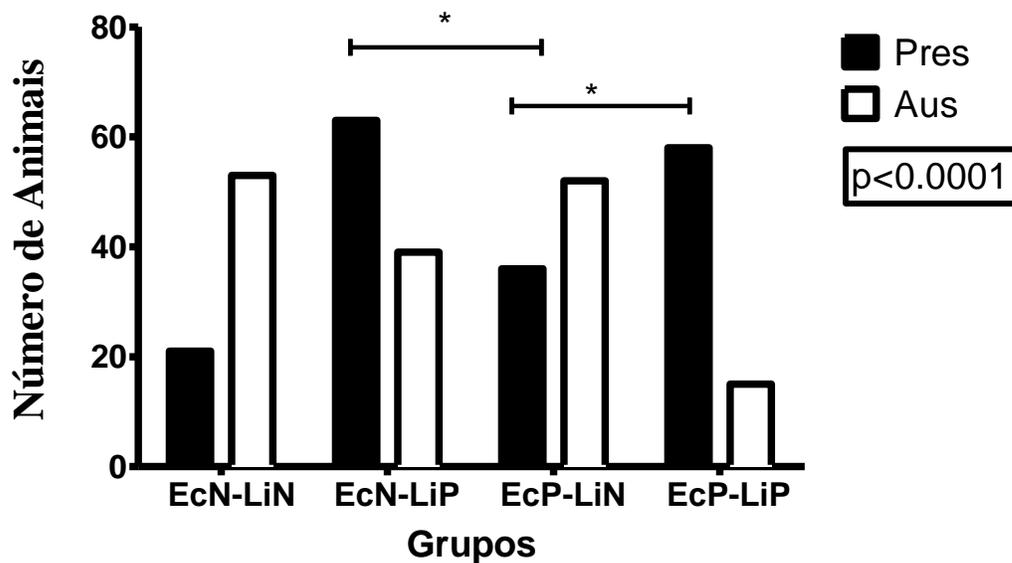
**Tabela III.** Frequência das alterações bioquímicas em cães infectados com *L. infantum*, *E. canis* ou coinfectados.

<b>Alterações Bioquímicas</b>	<b><i>L. infantum</i> (n=113)</b>	<b><i>E. canis</i> (n=152)</b>	<b>Coinfecção (n=80)</b>
Diminuição da úreia	15,8%	34,8%	6,8%
Aumento da úreia	6,8%	5,9%	5%
Diminuição da Creatinina	5,9%	6,7%	1,7%
Aumento da Creatinina	5,9%	7,6%	2,5%
Diminuição do ALT	2,5%	3,4%	0,8%
Aumento do ALT	6,8%	9,3%	8,5%
Hipoproteïnemia	8,6%	3,4%	5,2%
Hiperproteïnemia	39,6%	17,3%	22,4%
Hipoalbuminemia	48,1%	22,4%	41,3%
Hiperglobulinemia	43%	17,3%	38%

## 5.6 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

A fim de avaliar quais sinais físicos podem ajudar a distinguir um cão com infecção por *Leishmania infantum* dos que estão infectados com *Ehrlichia canis* ou coinfectados, analisamos os diferentes sinais físicos encontrados quanto ao tipo de infecção.

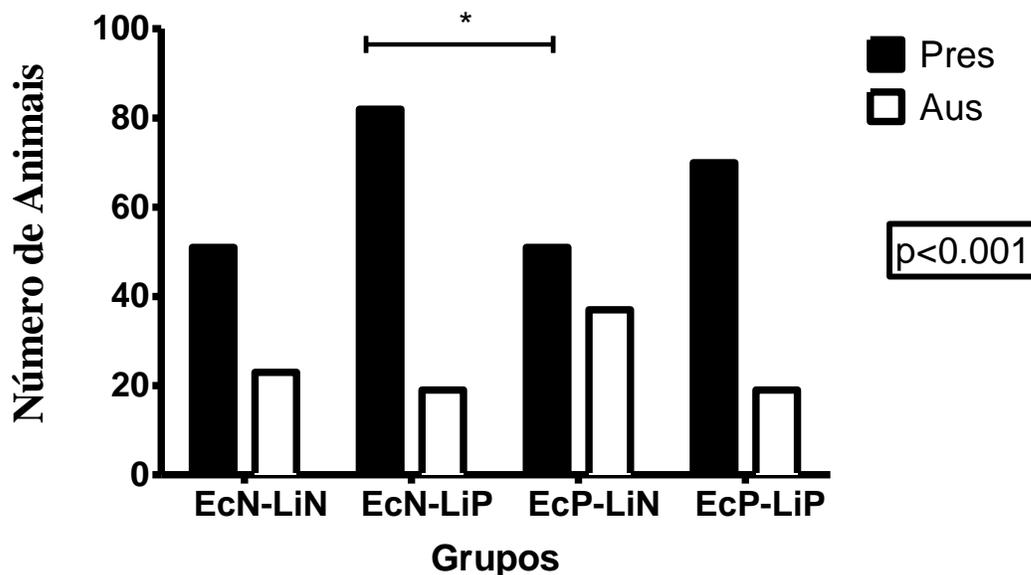
Em relação à presença de lesões na pele, dos 74 animais sem infecção, 21 apresentaram lesões e 53 não. Dos animais infectados apenas com *L. infantum*, 63 apresentaram esse sinal clínico, enquanto que dos com infecção somente por *E. canis*, 36 dos 88 cães apresentaram algum tipo de lesão na pele. Dos animais coinfectados, 15 dos 89 cães, não tinha nenhuma lesão na pele. Foi detectada uma diferença estatística entre os grupos de cães EcN-LiP e o grupo EcP-LiN. Além disso, dos cães que tinham infecção somente por *Leishmania*, há um número de animais com lesões de pele significativamente maior do que os que estavam duplamente infectados (Figura 12).



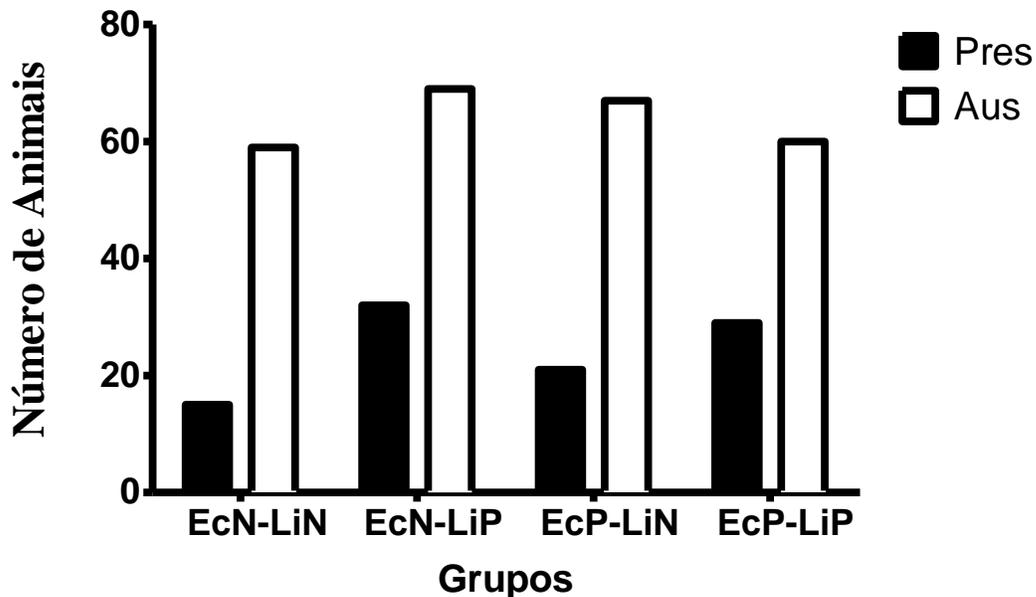
**Figura 12.** Frequência de animais com presença de lesões na pele avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,0001$ . Positivo para *E. canis* (P); Negativo para *E. canis* (N). EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo, *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74.

No grupo de cães infectados somente com *L. infantum* a frequência da linfadenopatia, 82 dos 101 animais, foi significativamente maior que a grupo dos infectados apenas por *Ehrlichia*, no qual 51 dos 88 cães apresentaram esse sinal clínico. Os animais não infectados, 51 de 74, apresentaram aumento nos linfonodos, além disso, nos coinfectados foi detectado esse sinal clínico na maioria dos cães (51/89) (Figura 13).

Não foram encontradas diferenças significativa entre os grupos de animais que tiveram perda de peso. Nos cães infectados somente com *L. infantum*, 69 dos 101, não tiveram perda de peso, de forma semelhante os cães infectados apenas com *E. canis*, apenas 21 tiveram perda de peso até o momento do atendimento clínico. No tocante aos animais não infectados, em apenas 15 dos 74 observou-se perda de peso, enquanto que nos duplamente infectados 29 perderam peso, e 60 não (Figura 14).



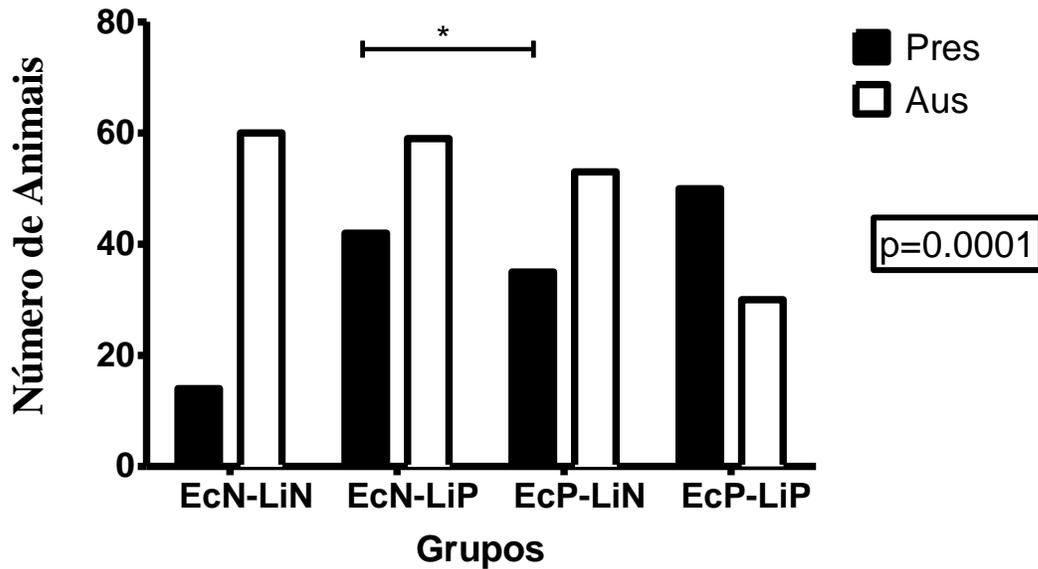
**Figura 13.** Frequência de animais com linfadenopatia avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,0001$ . EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo; *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74



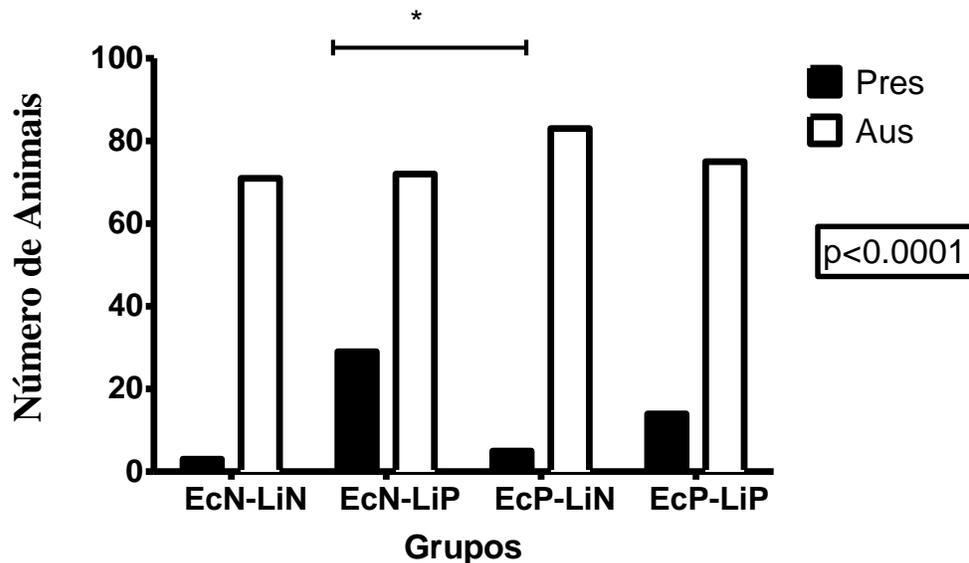
**Figura 14.** Frequência de animais com perda de peso avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,0001$ . EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo, *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74

A presença de animais com áreas com alopecia foi verificada em número significativamente maior no grupo mono infectado com *L. infantum* (42/101) em relação ao grupo positivo apenas para *E. canis* (35/88). Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente relevante entre si (Figura 15).

Dos 74 animais sem infecção, apenas três apresentaram apatia durante o exame clínico, enquanto que no grupo dos animais duplamente infectados 14 apresentaram o sintoma, e 75 não. Quando comparamos o grupo EcN-LiP (29/101) com o EcPLiN (5/101), o número de cães com apatia foi significativamente maior no primeiro grupo do que no segundo (Figura 16).

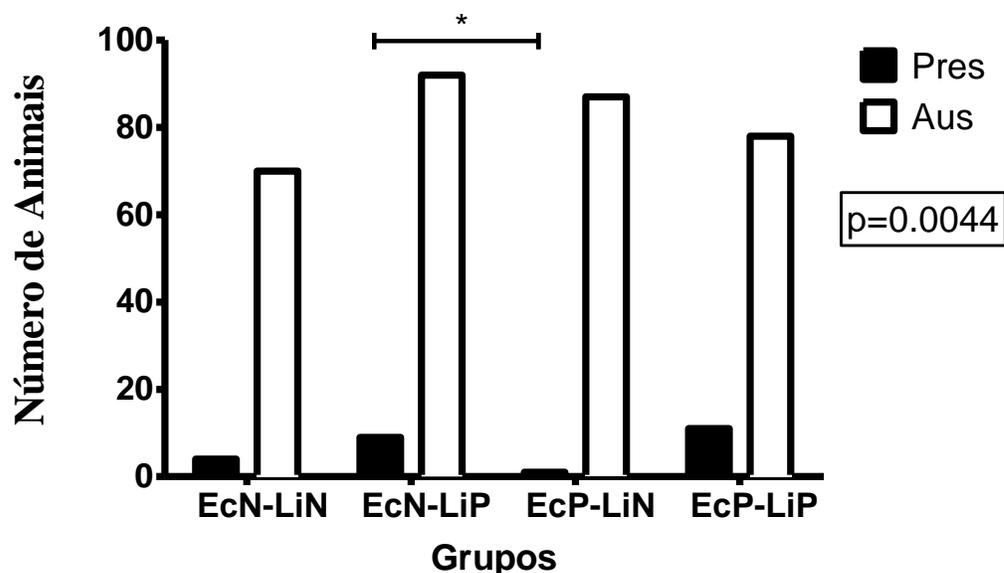


**Figura 15.** Frequência de animais com alopecia avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,0001$ . EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo, *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74.



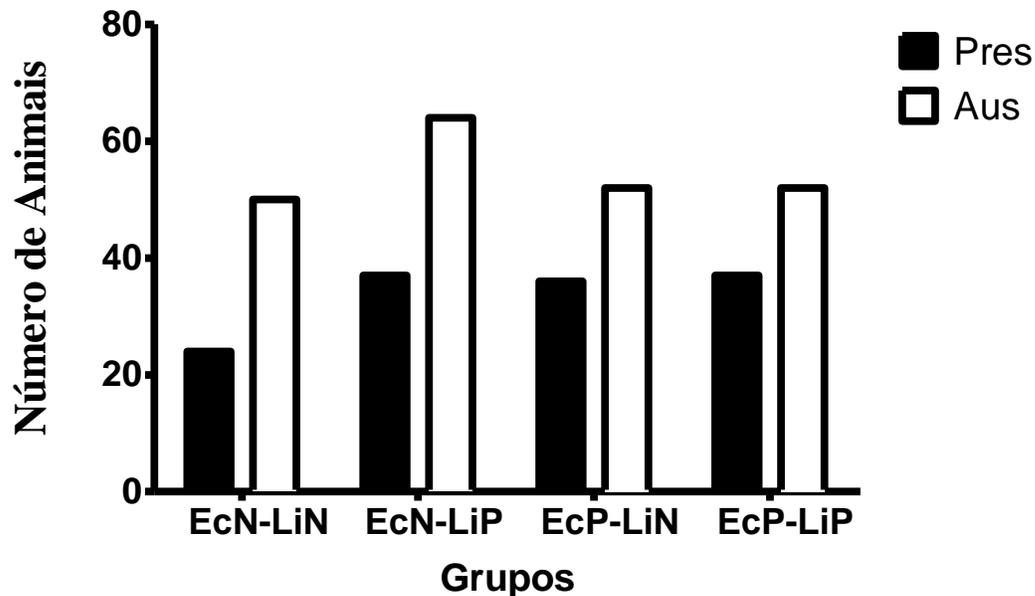
**Figura 16.** Frequência de animais que apresentavam apatia avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,0001$ . EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo, *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74

Nos animais duplamente infectados, 11 dos 78 cães apresentaram conjutivite no exame clínico, enquanto que nos não infectados, apenas 4 dos 74. Observou-se diferença significativa entre os grupos infectados apenas com *Leishmania* (9/101) e os infectados somente com *Ehrlichia* (1/87) (Figura 17).



**Figura 17.** Frequência de animais que apresentavam conjutivite avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,0001$  EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo, *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 84; Não infectados: 63.

Nos animais monoinfectados com *L. infantum*, 37 de 101, apresentam mucosas pálidas, enquanto que nos infectados com *E. canis*, em 36 de 88 animais foi verificado esse sintoma. Nos animais coinfectados, 24 tinham mucosas pálidas e 52 não. Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos (Figura 18).



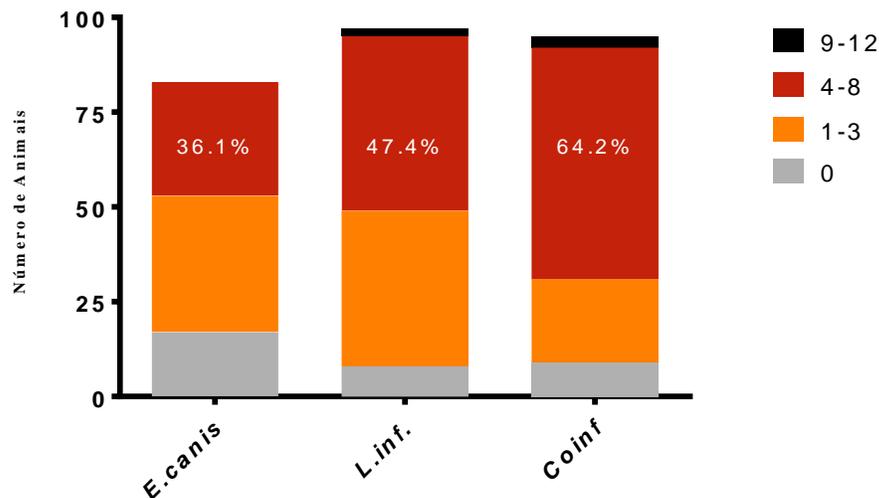
**Figura 18.** Frequência de animais que apresentaram mucosas pálidas avaliados quanto a infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ ). EcNLiN (*E. canis* negativo; *L. infantum* negativo), EcNLiP (*E. canis* negativo, *L. infantum* positivo), EcPLiN (*E. canis* positivo; *L. infantum* negativo), EcPLiP (*E. canis* positivo; *L. infantum* positivo).). Número de animais *Ehrlichia canis*: 88; *Leishmania infantum*: 101; Coinfectados: 89; Não infectados: 74

Nos 101 animais infectados apenas por *L. infantum* os principais sinais físicos foram (Tabela IV): linfadenopatia 92%, lesões na pele 74,2%, onicogrifose 41,6%, emagrecimento 37,6%, seborréia seca 16,8%, apatia e hiperqueratose 14,8%, uveíte e conjutivite 8,9%.

Avaliando-se os sinais físicos dos 88 animais infectados apenas com *E. canis*, os principais achados foram: linfadenopatia 57,3%, lesões na pele 41,5%, onicogrifose 40,02%, mucosas hipocoradas 39%, emagrecimento progressivo 24%, febre 11%, diarréia 3,7%, apatia, uveíte e epistaxe 1,2%. Nos 89 animais coinfectados os principais sinais físicos foram: linfadenopatia 76,8%, lesões na pele 67%, mucosas pálidas e onicogrifose 53,8%, seborréia 35,2%, emagrecimento 30,8%.

**Tabela IV.** Frequência de sinais físicos em cães infectados com *L. infantum*, *E. canis* ou coinfectados.

<b>Sinais Físicos</b>	<b><i>L. infantum</i></b> <b>(n=101)</b>	<b><i>E. canis</i></b> <b>(n=88)</b>	<b>Coinfectado</b> <b>(n=89)</b>
<b>Linfoadenopatia</b>	<b>92%</b>	<b>57,3%</b>	<b>76,8%</b>
<b>Lesões de pele</b>	<b>74,2%</b>	<b>41,5%</b>	<b>67%</b>
<b>Onicogribose</b>	<b>41,6%</b>	<b>40,2%</b>	<b>53,8%</b>
<b>Mucosas pálidas</b>	<b>40,6%</b>	<b>39%</b>	<b>53,8%</b>
<b>Emagrecimento</b>	<b>37,6%</b>	<b>24,4%</b>	<b>30,8%</b>
<b>Seborréia seca</b>	<b>16,8%</b>		<b>35,2%</b>
<b>Apatia</b>	<b>14,8%</b>	<b>1,2%</b>	<b>13,2%</b>
<b>Hiperqueratose</b>	<b>14,8%</b>		<b>15,4%</b>
<b>Uveíte</b>	<b>8,9%</b>	<b>1,2%</b>	<b>3,3%</b>
<b>Conjuntivite</b>	<b>8,9%</b>	<b>-</b>	<b>9,9%</b>
<b>Nódulos subcutâneos</b>	<b>7,9%</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Febre</b>	<b>6,9%</b>	<b>11%</b>	<b>12%</b>
<b>Esplenomegalia</b>	<b>5,9%</b>	<b>-</b>	<b>10,9%</b>
<b>Incordenação motora</b>	<b>4%</b>	<b>-</b>	<b>2,2%</b>
<b>Blefarite</b>	<b>4%</b>	<b>-</b>	<b>4,4%</b>
<b>Paresia do trem posterior</b>	<b>2%</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Hepatomegalia</b>	<b>2%</b>	<b>-</b>	<b>1%</b>
<b>Epistaxe</b>	<b>1%</b>	<b>1,2%</b>	<b>2,2%</b>
<b>Diárreia</b>	<b>1%</b>	<b>3,7%</b>	<b>-</b>
<b>Vômitos</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1%</b>



**Figura 19.** Número de sinais físicos em cães infectados com *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. Teste Qui Quadrado ( $\chi^2$ )  $p < 0,05$ .

A análise da quantidade de sinais físicos (escore clínico) de cada animal mostrou que tanto os animais infectados por *L. infantum* como os coinfectados possuem, em sua maioria, de 4 a 8 sinais físicos, tendo portanto uma enfermidade de gravidade moderada. Dentre os cães infectados apenas com *E. canis*, 43,3% apresentaram maior número de animais com doença leve (de 1 a 3 sinais físicos). O grupo de animais infectados com *L. infantum* e *E. canis*, com escore clínico de 9-12, foi significativamente maior do que nos animais infectados apenas com *E. canis*.

## 6 DISCUSSÃO

A fim de compreender melhor a interação *Leishmania-Ehrlichia*, quando infectam os mesmos macrófagos, e como a coinfeção *in vitro*, pode nos ajudar a entender a dinâmica dessas infecções *in vivo*, realizamos experimentos com células DH82. Essa linhagem celular foi escolhida uma vez que possuem morfologia semelhante a macrófagos normais (WELLMAN et al.,1988) e têm a capacidade de ser infectadas tanto por *E. canis* como por *L. infantum* (MAIA et al,2007).

Quando expostas a *E. canis*, após 4 horas de infecção, observamos que 20% das células estavam infectadas e essa infecção aumentou com o passar do tempo, até que no dia 18 pós infecção 100% das células continham a bactéria.

Quando as células DH82 foram infectadas com *Leishmania*, observamos que do primeiro ponto (4 horas) até 48 horas ocorre um aumento na porcentagem de células infectadas, que varia de 50 a 65%. A partir daí, a taxa de infectividade começa a decair até que finalmente no décimo oitavo dia não se observa mais parasitismo nas células. Entretanto, na coinfeção observou-se uma pequena quantidade de parasitismo tanto por *L. infantum* como por *E. canis* nas primeiras horas de infecção, sendo que a partir do quinto dia a infecção por *L. infantum*, o parasitismo diminui até não ser mais possível visualizar as formas amastigotas a partir do 12º dia, enquanto a infecção por *E. canis* aumenta até atingir 100% das células no 18º dia pós infecção.

Ou seja, a coinfeção *in vitro* diminui a infecção por *L. infantum*, entretanto não altera a infecção por *E. canis*. Vários fatores podem estar envolvidos neste efeito inibitório que a infecção por *E. canis* exerce sobre a infecção por *L. infantum*, sendo arriscado especular sobre isto na ausência de estudos dirigidos para explorar este fenômeno.

Após, os experimentos *in vivo*, realizamos um estudo epidemiológico na região urbana de Teresina, que é considerada uma área endêmica, tanto para Leishmaniose Canina como para Leishmaniose Humana (WERNECK et al, 2014). Para isso, primeiramente, realizamos teste sorológico ELISA, para leishmaniose em 664 cães atendidos no Hospital Veterinário de Teresina e em diversas clínicas particulares da cidade e encontramos uma frequência de 24%, já quando realizamos a PCR encontramos uma frequência de 29,1%. Entretanto, Paulan et al. (2013) ao pesquisarem 93 cães no município de Ilha Solteira, São Paulo, encontraram, um maior número de animais positivos na sorologia (37,6%) do que no teste parasitológico (26,9%). Essa diferença se

deve a maior sensibilidade e especificidade da PCR, utilizada nesse estudo, quando comparado com a cultura ou o exame direto do parasita.

No Brasil, estudos de soroprevalência, realizados no Nordeste, estão de acordo com nosso resultado, em Fortaleza, Ceará, de 428 animais estudados, 20% apresentaram sorologia positiva (SCHUBACH, 2004), e no estado do Rio Grande do Norte, os anticorpos para *Leishmania spp.* foram detectados em 28% (39/139) dos cães estudados (MATOS, 2006). Entretanto a frequência de cães doentes no Maranhão é bem superior ao encontrado em Teresina, sendo a soroprevalência em São Luís, Maranhão, de 51,61% (ABREU-SILVA et al., 2008), e no município de Raposa, de 47,8% (FELIPE, 2011).

Nas demais regiões do Brasil, a frequência de leishmaniose canina é consideravelmente menor, em Divinópolis, Minas Gerais, por exemplo, somente 4,63% dos cães estudados apresentaram sorologia positiva, e em Campinas, São Paulo, apenas 4% (VON ZUBEN et al., 2014). Em um estudo realizado nas proximidades da Mata Atlântica, observou-se prevalência de 20% (CURI, 2014).

Cães infectados por *L. infantum* apresentam uma grande variedade de sinais físicos não específicos. Além disso, durante a coinfeção com outro patógeno, os sinais físicos da LVC podem se sobrepor com os da segunda infecção, o que torna o diagnóstico um desafio, e pode dificultar a vigilância epidemiológica e a adoção de medidas de controle (OLIVEIRA et al, 2009).

Neste trabalho, analisamos 352 animais quanto a sintomatologia clínica, destes 101 cães foram positivos para *Leishmania*, no PCR. Os sinais físicos mais frequentes nesses cães foram linfadenopatia em 92%, lesões na pele em 74,2%, onicogribose em 41,6%, perda de peso em 37,6%, seborréia seca em 16,8%, apatia e hiperqueratose em 14,8%, uveíte e conjutivite em 8,9%. Esses dados são confirmados por diversos outros autores que encontraram uma sintomatologia similar em cães com Leishmaniose (GONZÁLEZ et al, 1990; FERRER et al, 1991; CIARAMELLA et al, 1997; REIS et al, 2006; CURI, 2014; LIMA; SILVA; DOS-SANTOS, 2014).

Resultado semelhante também foi encontrado por Laranjeira et al. (2014), ao estudarem 134 cães com Leishmaniose, observaram que 70 animais eram sintomáticos e que os sinais físicos mais frequentes foram lesões cutâneas (84.4%), linfadenopatia (76.6%), esplenomegalia (66.0%), perda de peso (45.5%), onicogribose (28.6%), e hepatomegalia (27.3%).

Quanto às alterações hematológicas, nos cães infectados por *Leishmania infantum*, as mais importantes foram: anemia normocítica normocrômica em 42,5% dos cães, trombocitopenia em 39,8%, leucocitose em 16,1% e eosinopenia em 11,9%. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por outros autores que relataram que a característica mais notável de distúrbios hematológicos associados à LVC é a anemia normocítica normocrômica (KEENAN, 1984; CIARAMELA, 1997; COURA-VITAL et al, 2011). Além disso, anemia, eosinopenia, linfopenia e monocitopenia também são características associadas à grave apresentação clínica da LVC (REIS et al, 2006; COURA-VITAL et al, 2011)

Mendonça et al. (2015) ao trabalharem com 98 cães em nossa mesma área - Teresina, Piauí - observou linfadenopatia, lesões de pele e emagrecimento como os três principais sinais físicos em cães com leishmaniose visceral. As alterações hematológicas mais comuns, nesses cães, foram anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia. Além disso, foi relatado redução da albumina sérica e no número de eritrócitos, linfócitos e eritrócitos em relação ao grupo controle. Esses dados estão de acordo com os que encontramos nos cães com leishmaniose visceral em nosso estudo.

É possível que a anemia esteja relacionada a fatores como o aumento da hemólise, com aumento do baço e do fígado, associado a uma resposta inflamatória à infecção por *L. infantum* (SAEED, 1998). Além disso, uma redução dos níveis plasmáticos de ferro, na presença de um grande aumento das reservas de ferro, sugere que a hiperplasia reticuloendotelial foi acompanhada por retenção anormal de ferro por macrófagos típicos da anemia em doenças crônicas. Isso pode limitar a resposta eritropoiética na anemia durante a leishmaniose visceral crônica (PIPPARD, 1986). Já De Luna et al. (2000) sugeriram que a anemia pode resultar de uma anormal fluidez da membrana dos eritrócitos na LVC, levando ao sequestro mecânico de eritrócitos no baço e a alterações nos mecanismos de citoaderência dos eritrócitos. Amusategui et al. (2003) relataram que os cães assintomáticos apresentaram contagem de eritrócitos, valores de hemoglobina e hematócrito mais elevados em comparação com cães oligossintomáticos e sintomáticos.

Nicolato et al. (2013) observaram pancitopenia, linfocitopenia e eosinopenia, em animais sintomáticos. Nos cães analisados nesse estudo, também observamos a redução do número de leucócitos (16,1% dos cães), eosinófilos (11,9%), linfócitos (8,5%) e monócitos (4,2%).

Em nosso estudo, a frequência de infecção em cães por *E. canis* em Teresina-Piauí foi de 35%, similar ao encontrado por Souza et al. (2010), em Salvador, 35,6%, ao utilizar a imunofluorescência indireta como método diagnóstico, e 34,5% desses animais continuaram positivos na técnica de PCR. Resultado semelhante foi encontrado, também, em Recife, onde a prevalência foi de 38,04% (RAMOS, 2010), e em Rondônia, 37,9% (AGUIAR et al., 2007).

Já no Rio Grande do Sul, apenas 4,8%, dos 389 cães estudados foram soropositivos para *E. canis* (SAITO, 2008). Enquanto que no Paraná a frequência foi de aproximadamente 45% (VIEIRA et al, 2013)

Silva et al (2010) observaram que 42,5% dos animais estudados apresentavam infecção por *E. canis* em Cuiabá -Mato Grosso, entretanto não encontrou nenhuma relação entre raça, gênero ou idade e a infecção pelo parasita.

Costa et al. (2007), analisaram 226 cães no estado de Minas Gerais e observaram que 65,6% dos cães de Nanuque, 24,7% dos de Lavras, e 37,8% dos de Belo Horizonte possuíam anticorpos para *E. canis*. Os autores também relatam que cães machos sem raça definida, com idade superior a 5 anos, tinham as taxas mais altas de positividade, dado que corrobora com nosso estudo, no qual a positividade em machos foi superior à de fêmeas, porém sem diferença estatística. Entretanto, a idade com maior número de animais positivos foi de 1 a 5 anos, enquanto cães com mais 5 anos apresentaram menor taxa de positividade por *E. canis*. Por outro lado, Ueno et al. (2009) encontraram uma taxa de infecção significativamente maior (65%) em cães com menos de 12 meses, o que não foi observado em nosso estudo, uma vez que não observamos diferença estatística em relação a gênero e idade.

A EMC pode ocorrer nas formas aguda subclínica e crônica. Na fase aguda os sinais físicos mais frequentes são febre, apatia, letargia, anorexia, linfadenopatia e esplenomegalia (SKOTARCZAK, 2003). Lesões oftalmológicas e neurológicas também podem ser encontradas (HARRUS; WANER, 2011). A fase crônica é similar à fase aguda, porém com sintomatologia mais severa (WANER et al., 1995).

Os sinais físicos mais frequentes nos animais infectados com *E. canis* desse estudo foram: linfadenopatia (57,3%), lesões na pele (41,5%), onicogrifose (40,02%), mucosas hipocoradas (39%) e emagrecimento progressivo (24%). A sintomatologia encontrada em nosso estudo contrasta com a verificada por Ueno et al. (2009), que relatam que os principais sinais físicos nos cães doentes foram diarreia (55,2%), apatia (47%) e anorexia (42,4%), e com Villaescusa et al.,

2012 , que encontraram como principais sinais físicos perda de peso, sangramentos, apatia e febre.

A sintomatologia clínica em cães com EMC é numerosa, e inclui sinais multisistêmicos, oculares, neuromusculares e articulares (NEER; HARRUS, 2006). Essa diversidade de manifestações clínicas pode explicar as diferenças na sintomatologia clínica encontrada em diversos trabalhos. Além disso, a presença de coinfeções não diagnosticadas podem contribuir para essa diversidade clínica.

A Erliquiose canina pode causar mudanças dramáticas nos parâmetros hematológicos. Em diversos estudos a contagem de células brancas, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, células vermelhas, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e alanina transferase foram significativamente menores em cães com erliquiose canina. Entretanto, em outros estudos os níveis de ALT (alanina transferase) foram significativamente maiores em animais doentes, o que sugere que o fígado é um órgão bastante afetado durante a infecção por *E. canis* (WANER et al., 1995; MCQUISTON, 2003). Anemia, leucopenia e trombocitopenia são achados comuns em cães com EMC (HARRUS; BARK; WANER, 1997; MACIEIRA et al, 2005; HARRUS; WANER, 2011; SUKSAWAT et al., 2001; UENO et al., 2009).

Nesse estudo, também, encontramos como principais achados hematológicos nos cães com erliquiose trombocitopenia, anemia, leucocitose e eosinopenia.

Bulla et al. (2004), ao estudarem cães com EMC concluíram que a contagem de plaquetas foi o melhor preditor da EMC, e sugerem que este pode ser usado como teste de triagem, em caso de suspeita de erliquiose, no qual cães com contagem de plaquetas menor que 200 plaquetas/ $\mu$ l têm maior probabilidade de estarem infectados com *E. canis* do que cães com contagem maior de plaquetas. Nosso estudo corrobora com esses dados, uma vez que encontramos uma quantidade significativamente menor de plaquetas em animais com erliquiose do que nos animais com outras patologias, inclusive Leishmaniose.

Uma vez que a trombocitopenia é um achado comum em cães infectados, muitos profissionais a utilizam como indicação para o tratamento com antibiótico, especialmente em áreas com alta prevalência da enfermidade. Entretanto, existe um grande número de doenças que podem causar trombocitopenia, incluindo trombocitopenia imune mediada, neoplasias, além de diversas doenças inflamatórias e infecciosas (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002).

Santos et al. (2009), ao estudarem cães com trombocitopenia, encontraram 46,7% desses cães, infectados com outros patógenos que não a *E. canis*, além disso observaram uma alta incidência (25,4%) de animais infectados com a bactéria, porém sem trombocitopenia. Dessa forma, além dos aspectos clínicos e laboratoriais, testes complementares, como PCR, devem ser realizados, a fim de evitar o uso desnecessário ou indevido de antibióticos (MACIEIRA et al, 2005).

A epidemiologia da erliquiose e da leishmaniose caninas se sobrepõe em diversas áreas do mundo, uma vez que a atividade do vetor e os períodos de transmissão são similares entre os dois patógenos (CORTESE et al, 2010; GAUNT et al, 2010; COUTO, 2010). Os dois agentes infecciosos são disseminados da pele para o baço, fígado e medula óssea, e ativam mecanismos imunes que induzem uma grande variedade de respostas imunopatológicas (ANDRADE et al., 2014). O impacto de um dos patógenos, durante a coinfeção, no outro ainda é desconhecido. O aumento da presença de sinais físicos suporta a hipótese de que há um sinergismo no efeito patológico entre os patógenos (MEKUZAS et al, 2009).

Uma vez que os ensaios sorológicos podem apresentar reações cruzadas (como os encontrados entre *E. canis* e *E. chaffeensis*; *A. platys* e *A. phagocytophilum*; e *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*), e a detecção direta desses patógenos por meio de esfregaços sanguíneos apresentam baixa sensibilidade e especificidade, especialmente em casos de infecção crônica ou baixa parasitemia, as técnicas moleculares têm um papel importante como uma ferramenta para a detecção e diferenciação de patógenos que infectam animais e seres humanos (LITTLE, 2010).

Paulan et al. (2013) detectaram anticorpos séricos simultaneamente para *L. infantum* e *Ehrlichia spp.* em 37,6% dos 91 cães utilizados. Nesses animais os sinais físicos mais frequentes foram perda de peso, onicogribose, linfadenopatia, alopecia e outras alterações dermatológicas. Já em nosso trabalho, a frequência da coinfeção foi de 12,1% (80/664), entretanto, foi utilizada a PCR para detecção, tanto da *E. canis* como da *L. infantum*. René-Martellet, et al.(2015), ao utilizar a PCR encontrou uma taxa de coinfeção *Leishmania-Ehrlichia* de apenas 2%.

Os sinais físicos mais frequentes em cães duplamente infectados foram linfadenopatia (76,8%), lesões na pele (67%), mucosas pálidas e onicogribose (53,8%), seborrèia (35,2%) e emagrecimento (30,8%), semelhante ao que foi encontrado por Paulan et al. (2013).

Dessa forma, estamos de acordo com Oliveira et al. (2008) quando afirmam que as altas taxas de prevalência desses dois patógenos em áreas endêmicas é muito mais sugestiva de coinfeções do que de reação cruzada de anticorpos.

Em nosso trabalho concluímos que a presença da coinfeção aumenta a severidade da doença quando se compara aos animais infectados por apenas um parasita. Outrossim, observamos que a frequência de animais com lesões de pele, linfadenopatia, alopecia, apatia e conjuntivite foi maior em animais infectados apenas com *Leishmania* do que nos monoinfectados com *E. canis*, porém não em relação aos duplamente infectados. Além disso, os cães que tinham infecção somente por *Leishmania* têm um número de animais com lesões de pele significativamente maior do que aqueles que estavam duplamente infectados.

A coinfeção com múltiplas CVBDs impacta a gravidade das alterações hematológicas em cães, e coloca desafios em termos de estratégias terapêuticas a aplicar a cada paciente individual (DE CAPRARIIS, 2011). Por exemplo, a *L. infantum* pode prejudicar a resposta imune celular e humoral do hospedeiro, o que pode favorecer o estabelecimento ou a reativação de uma infecção pré-existente de *E. canis* (BARBIÉRI, 2006). Além disso, a *E. canis* provoca uma redução no complexo principal de histocompatibilidade de receptores de classe II, o que poderia reforçar a evolução clínica da LVC (HARRUS et al, 2003). De Tommasi et al. (2013) analisaram cinco cães coinfectados com *L. infantum* e *E. canis* e relatam que os sinais físicos mais frequentes foram apatia, perda de peso, hipertermia, anorexia, mucosas pálidas, linfadenomegalia, dermatites, lesões cutâneas, tosse e epistaxe, ao passo que as alterações laboratoriais foram principalmente anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia.

Esses dados estão de acordo com os encontrados por nosso grupo, uma vez que os cães coinfectados apresentaram anemia normocítica normocrômica em 71,6% dos casos e trombocitopenia em 60%. Ademais, outro estudo mostrou que anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia foram características constantes encontradas em grupos infectados apenas com *L. infantum* e duplamente infectados, e que os valores de albumina e do hematócrito diferiram significativamente entre os dois grupos (ANDRADE et al., 2014).

O mesmo foi encontrado por Cortese et al. (2010), que descrevem como principal achado hematológico em cães coinfectados a anemia normocítica normocrômica, e sugerem que a coinfeção altera a função plaquetária, em vez de diminuir o número de plaquetas quando comparado a animais monoinfectados.

Entretanto, nosso grupo de animais sem infecção por *leishmania* ou *erhlichia* apresentou maior número de plaquetas dentre todos os grupos, sendo essa diferença significativa em relação ao grupo monoinfectado com *E. canis*. Foi encontrada também diferença significativamente maior no número de plaquetas nos cães infectados por *L. infantum*, mesmo coinfectados, quando comparado aos infectados apenas por *Ehrlichia*. Além disso, sugerimos que os valores do hematócrito e de hemácias podem ajudar a distinguir cães coinfectados *Leishmania-Ehrlichia* dos monoinfectados por *L. infantum* ou por *E. canis*. Outro dado relevante observado em nosso estudo foi que a coinfeção diminui significativamente o número de monócitos e polimorfonucleares em relação a monoinfecção, entretanto o número de linfócitos não apresentou diferença entre os grupos.

Os dados clínicos e hematológicos de cães infectados com *L. infantum* e com *E. canis*, mostram que a LVC favorece a exacerbação dos sinais físicos, enquanto que a EMC faz com que ocorra o agravamentos dos distúrbios hematológicos.

Além disso, nossos resultados mostram uma sinergia na coinfeção de cães por *E. canis* e *L. infantum* que resulta num quadro clínico com a presença de maior número de sinais físicos. A associação de múltiplos sinais parece ser mais relevante que o agravamento de sinais específicos na piora clínica de cães confutados em relação aos cães infectados por apenas um dos patógenos estudados.

Concluimos que em áreas endêmicas para LVC e EMC, a presença da coinfeção, favorece o aumento do número de sinais físicos e das alterações hematológicas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A.L. et al. Seroprevalence, clinical and biochemical data of dogs naturally infected by *Leishmania* and *phlebotominae* sandfly fauna in an endemic area in São Luis Island, Maranhão State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 1, p. 197-103, 2008.
- AGUIAR, D.M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: *Ixodidae*) ticks from Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 44, n. 1, p. 12632, 2007.
- AGUIAR, D. M. et al. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 28, n. 164, n. 3-4, p. 315-321, 2013.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniasis: immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.137, p. 275–283, 2010.
- ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, p. 359–365, 2012.
- ALMOSNY, N.R.P. **Ehrlichia: avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados.** 202 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, 1998.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- ALVES, R.N. et al. The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. **Vet. Microbiol.**, 168, p. 442–446, 2014.
- AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.
- ANDRADE, G.B. et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Braz. J. Vet. Parasitol.** v. 23, n. 4, p. 509-515, 2014
- ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina: revisão. **Clin. Vet.**, v. 4, n. 19, p. 31-38, 1999.
- ANZIANI, O.S; EWING, S.A; BARKER, R.W. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. **Am J Vet Res.**, v. 51, v.6, p.926-31, 1990
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

- BANETH, G. et al. Vector-Borne Diseases -constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. **Parasit. Vect.**, v. 5, p. 55, 2012.
- BARBIERI, C.L. et al. Immunology of Canine Leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006. Disponível em< <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x>.> Acesso em: 12 abr 2015.
- BEUGNET, F.; MARIÉ, J.L. Emerging Arthropod-borne Diseases of Companion Animals in Europe. **Vet Parasitol.**, v. 163, n. 4, p. 298-305, 2009.
- BIO-MANGUINHOS. EIE - **Leishmaniose Visceral Canina** Bio-Manguinhos. Disponível em: <[http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM\\_014\\_08Bk\\_EIEleish\\_can.pdf](http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BM_014_08Bk_EIEleish_can.pdf).> Acesso em: 23 jan 2015.
- BITSAKTSIS, C. et al. T cell- independent humoral immunity is sufficient for protection against fatal intracellular ehrlichia infection. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4933–4941, 2007.
- BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet.Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 345–351, 1997.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- BRANGER, S.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p. 4822–4828, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta no 01/2001 – CGDT/DEVIT/SUS/MS. **Esclarecimento sobre a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2645–2651, 1998.
- BREARLEY, G. et al. Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes. **Biol. Rev.**, v. 88, p. 427–442, 2012.
- BRIERE, F. et al. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (SIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 757–762, 1994.
- BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic área. **Vet. Res.**, v.35, p.141–146, 2004.

- CAMPOS, J.; H.; F.; COSTA, F.; A.; L. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in teresina, piauí, brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 297-300, 2014.
- CARDOSO, L.; CABRAL, M. Leishmania and Canine Leishmaniasis. **Rev. Port. C. Vet.**, v. 527, p. 122-141, 1998
- CARDOZO, G.P. et al. A glass bead protocol for recovery of host cell free *Ehrlichia canis* and quantification by Sybr-green real-time PCR. Brief Note. **Biocell**, v. 35, n. 1, p. 35-36, 2011.
- CASTRO, M.B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasitol.**, v.119, p. 73-86, 2004.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, p. 67-75, 2005.
- CHIKAZAWA, S. et al. Erythrophagocytosis enhances heme-dependent cytotoxicity of antimalarial drugs in canine histiocytic sarcoma cell line DH82. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 76, n. 2, p. 249-253, 2014.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.
- CIARAMELLA, P. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs natural infected by *Leishmania infantum*. **Vet. J.**, v. 169, p.465-467, 2005.
- CODNER, E.C.; FARRIS-SMITH, L.L.J. Characterization of subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 189, p. 47-50, 1986.
- CODNER, E.C. et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, p. 2286-2291, 1992.
- COLOMBO, F.A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 267-274, 2011.
- CORTESE, L. et al. Platelet Aggregation and Haemostatic Response in Dogs Naturally Co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **J. Vet. Med.**, v. 53, p. 546-548, 2006.
- \_\_\_\_\_. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Vet. J.**, v. 188, n. 1, p.118-121, 2010.
- \_\_\_\_\_. Effects of therapy on haemostasis in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, or both combined. **Vet. Record**, v. 164, p. 433-434, 2009.
- \_\_\_\_\_. *Ehrlichia canis* infection in dogs in BeloHorizonte, Brazil. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.
- COSTA, C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.24, n. 1, p.21-25, 1991.

- COSTA, L.M.J. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Vet J.**, v.174, n. 3, p.673-676, 2007.
- COUTO, C. G. Doenças Rickettsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, E. G., **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**, 2 ed. São Paulo: Roca. p. 138-140, 2008.
- \_\_\_\_\_. Serological study of selected vector-Born diseases in shelter dogs in Central Spain using point-of-care assays. **Vector Born and Zoonotic Dis.**, v.10, 2010.
- COUTINHO, M.T.Z. et al. Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.55, p.128-149, 2005.
- COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Vet. J.**, v.190, p. 43–47, 2011.
- \_\_\_\_\_.Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infectionof dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular meth-ods. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, 2011.
- \_\_\_\_\_.Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PloS One**, v. 9, 2014.
- CORREA, A.P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p.267-274, 2007.
- COURTENAY, O. et al. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, p. 407-414, 2002.
- COX, F.E.Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, v. 122, Suppl 1, p. S23-S38, 2001. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1017/S003118200001698X>>. PMID:11442193 > Acesso em 10 mai 2015.
- CURI , N.H.A. et al. Factors Associated with the Seroprevalence of Leishmaniasis in Dogs Living around Atlantic Forest Fragments. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- DA COSTA-VAL, A.P. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet. J.**, v. 174, p. 636–643, 2007.
- DAGNONE, A.S. et al.Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 117, n. 4, p.285-290, 2003.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy. **Parasitol Res.**, v. 106, p. 857-860, 2010.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D.Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443–449, 2000.

- DAVOUST, B. et al. Study of ehrlichiosis in kennel dogs under treatment and prevention during seven months in Dakar (Senegal). *Comparative Immunology, Microbiol. Infect. Dis.*, v. 36, p. 613–617, 2013.
- DAY, M.J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasit. Vectors*, v. 4, n. 1, p. 49, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-49>> PMID:21489237> Acesso em: 14 maio 2015.
- DE LUNA, R. et al. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anaemia. *J. Comp. Pathol.*, v. 122, p. 213–216, 2000.
- DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p. 463-469, 1994.
- DE TOMMASI, A.N. et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasites & Vectors*, v. 6, p. 97, 2013. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/97>> Acesso em: 22 abr 2015.
- DIEBOLD, J. et al. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. *Histopathology*, v. 37, p. 199–211, 2000.
- EDDLESTONE, S. et al. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 21, p. 1237-1242, 2007.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies of morulae of *E. canis*. *J. Small. Anim. Pract.*, v. 33, p. 540–543, 1991.
- FELIPE, I.M. et al. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.
- FELICIANGELI, M.D. et al. 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. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet. Pathol.*, v. 28, n. 4, p. 342-343, 1991.
- FERNANDES, C.B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, v. 32, n. 11, p. 1287-1295, 2014.
- GAL, A. et al. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. J.*, p. 212-217, 2008.
- GALVÃO, R.C. et AL. Comparação entre tratamentos contra erliquiose canina em animais com os sintomas da afecção, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0943-2.pdf>> Acesso em: 22 fev 2015

GAUNT, S.D. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 33, 2010.

GONÇALVES, L.R. et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, n. 3, p.407-412, 2014. Disponível em :<<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014071>> Acesso em: 22 abr 2015.

GONZÁLEZ, J.L et al. Erosive colitis in experimental canine leishmaniasis. **J. Vet. Med.**, v, 37, p. 377-382, 1990

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 54–59, 2012.

GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. vi. Review. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 32, n. 6, p. 1313-74, 2002.

GOMPPER, M.E. Free-ranging Dogs & Wildlife Conservation. Oxford: Oxford University Press. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 58, p. 227–250, 2013.

GUTIÉRREZ, C.N. et al. Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 37, n. 3, p. 258-265, 2008. doi: 10.1111/j.1939-165X.2008.00046.x.

HARHAY, M.O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 9, p.403-409, 2011.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v. 19, p. 431–441, 1997.

HARRUS, S. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2745-2749, 1999.

\_\_\_\_\_. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, v. 99, p. 63–71, 2001.

\_\_\_\_\_. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Microbiol.**, v. 86, p. 361-368, 2002.

\_\_\_\_\_. Down regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Immunopathol.**, v. 96, n. 3-4, p. 239-243, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.08.005>. PMID:14592737 > Acesso em: 30 maio 2015.

\_\_\_\_\_. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 48, p.4488–4490, 2004.

- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **Vet. J.**, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011.
- HEGARTY, B.C. et al. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.9, p. 32–38, 1997.
- HEINRICH, F. et al. Passage-dependent morphological and phenotypical changes of a canine histiocytic sarcoma cell line (DH82 cells). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 163, p. 1-2, p.86-92, 2014. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.006. Epub 2014 Nov 14.
- HEMELT, I.E. et al. Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocyte cultures. **Cornell Vet.**, v. 70, p. 37–42, 1980.
- HUXSOLL, D. L. et al. Tropical Canine Pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v. 157, p. 1627-1632, 1970.
- IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **J. Clin. Microbiol.**, p. 32, v. 1644–1649, 1994.
- ISMAIL, N.; BLOCH, K.C.; MCBRIDE, J.W. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. **Clin. Lab. Med.**, v. 30, n. 1, p.261-292, 2010.
- 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). **Vet Parasitol.**, v.74, p.277-88, 1998.
- KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **J. Immunol.**, v. 153, p. 4948–4958, 1994.
- KELLAR, K.L. et al. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. **Cytometry**, v. 45, p. 27–36, 2001.
- KEENAN, C.M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 74–79, 1984.
- LABRUNA, M.B. et al. Prevalencia de carrapatos em caes de areas rurais da regio norte do Estado do Parana. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 5, p. 553- 556, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000500007>> Acesso em: 15 fev 2015.
- LAGE, R.S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, p. 135–145, 2007.
- LARANJEIRA, D.F. et al. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Rev. Saude Publ.**, v. 48, n. 4, p. 563-571, 2014.
- LAUMMAUNWAI P, et al. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. **South. Asian J. Trop. Med. Publ. Health.**, v. 45, n. 5, p. 1157-1166, 2014.

- LAURENTI, M.D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *leishmania (leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet. Parasitol.**, v. 23, p. 196, n. 3-4, p.296-300, 2013.
- LAURENTI, M.D. et al. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 205, n. 3-4, p.444-450, 2014.
- LEALA, G.G.A. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, p.11, 2014.
- LEIB, M.S. et al. Plasmacytic lymphocytic colitis in the dog. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim)**, v. 4, n. 3, p.241-246, 1989.
- LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 40, p. 11, 2010.
- LIMA, I.S.; SILVA, J.S.; DOS-SANTOS, W. L.C.. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.
- LUCEY, D.R.; CLERICI, M.; SHEARER, G.M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 532–562, 1996.
- LUKES, J.; MAURICIO, I.L.; SCHÖNIAN, G. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. US A.**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.
- MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Convencional and molecular techniques using different tissues. **Vet. J.**, v. 179, n. 1, p.142-144, 2007.
- MANNA, L. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res. Vet. Sci.**, v. 87, p. 76–78, 2009.
- MACIEIRA, D.B. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, v.34, p. 44-48, 2005.
- MARZOCHI, M.C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.
- MATOS, M.M. et al. Occurrence of visceral leishmaniasis in dogs of Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciê. Animal**, v. 16, n. 1, p. 51-54, 2006.
- MAGNABOSCO, C. **Populations of domestic dogs and cats of São Paulo city: profile gotten through health survey.** 2006. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo-USP. Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2006.
- MCDADE, J. E. Ehrlichiosis: a disease of animals and humans. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 609-617, 1990.

- MCHUGH, T.M. Flow microsphere immunoassay for the quantitative and simultaneous detection of multiple soluble analytes. In: DARZYNKIEWICZ, Z.; ROBINSON, J.P.; CRISSMAN, H.A. (Eds.). **Methods in Cell Biology**, ed. 2, New York: Academic Press, 1994. p. 575–595. v. 42.
- MCQUISTON, J.H.; MCCALL, C.L.; NICHOLSON, W.L. Ehrlichiosis and related infections. **Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 223, n. 12, p. 1750-1756, 2003.
- MEDEIROS, A.M.M.; LIMA, A.K.F. Occurrence of canine Ehrlichiosis in Mossoró. **Ciênc. Anim.**, v.14, n. 1, p.53-57, 2004.
- MENDONÇA, L.I. **Testes para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: infecção e infectividade**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- MENDONÇA, L.I et al. Biochemical and hematological changes in dogs naturally infected by *Leishmania (infantum) chagasi*. **Clín. Vet.**, n.116, p.78-84, 2015.
- MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet. Parasitol.**, v.177, p. 39–49, 2011.
- MEKUZAS, Y. et al. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, p. 30–31, 2009.
- MOMO, C.; JACINTHO A.P.P.; VASCONCELOS, R.O. Morphological Changes in the Bone Marrow of the Dogs with Visceral Leishmaniasis. **Vet. Med. Int.**, 2014. doi: 10.1155/2014/150582. Published online Mar 5,
- MORAIS, H.A.; ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados com *Ehrlichia spp*. **Clín. Vet.**, v.48, p. 28-30, 2004.
- MOREIRA, S. M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.
- MORENO, J.; ALVAR, J.; Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.
- MOONARMART, W. et al. Clinical history and hematological findings among canines with monocytic ehrlichiosis. **South. Asian J. Trop. Med. Publ. Health**, v. 45, n. 1, 2014.
- MYLONAKIS, M.E. et al. Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in experimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **Vet. Microbiol.**, v. 169, p. 198–202, 2014.
- MURRAY, H.W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.**, v.70, n. 11, p. 6284-6293, 2002.
- NEER, T.M. Canine monocytic granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed). **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 139-147.

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. (Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Saunders Elsevier, St.Louis, 2006. p. 203–216.

NICHOLSON, W.L. et al. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends Parasitol.**, v. 26, n. 4, p. 205-212, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007>> PMID:20207197> Acesso em: 10 mar 2015.

NICOLATO, R.C. et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013. Disponível em: <http://doi:10.1371/journal.pone.0082947>.

OLIVEIRA, D. et al. Ehrlichia canis antibodies detection by “DOT ELISA” in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, p. 1-6, 2000.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent and antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. IgG subclass profile of serum antibodies to Leishmania chagasi in naturally infected and vaccinated dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 162, n. 1-2, p. 16-22, 2009.

OLIVEIRA, F.M.L. **Ações de controle da leishmaniose visceral em Teresina/PI**. 2014. 57 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveitis in dogs infected with Ehrlichia canis. **Ciênc. Rural**, v. 34, n. 4, p. 1289-1295, 2004.

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

\_\_\_\_\_. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. **Trends in Parasitol.**, v. 25, n. 5, p. 228–235, 2009.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; CAPELLI, G. Toward diagnosing leishmania infantum infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.16, n. 3, p. 337-343, 2009.

PAULAN, S.C. et al. Seroprevalence rates of antibodies against Leishmania infantum and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 162-166, 2013

PAZ, G.F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of Rhipicephalus sanguineus (Acari Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res.**, v. 106, p. 523-528, 2010.

PARADIES, P. et al. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by Leishmania infantum. **Vet J.**, v. 186, n. 3, p. 370-373, 2010. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.011>

PEDROSO, T.C. **Eficácia da doxiciclina e da combinação com o dipropinato de imidocarb no tratamento de Ehrlichia canis em cães.** 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2006.

PETERS, I.R. et al. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 10, n. 1-2, p.101-111, 2005.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 1594–1600, 1995.

PIPPARD, M.J. et al. Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 80, p. 317–323, 1986.

PINTO, I.S. et al. Sand fly vectors (Diptera, *Psychodidae*) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **J. Vector Ecol.**, v. 37, p. 90–96, 2012.

QUINNELL, R.J.; DYE, C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*) in Amazonian Brazil. **Med. Vet. Entomol.**, v. 8, p. 219–224, 1994.

RABINOWITZ, P.M. et al. Animals as sentinels of human environmental health hazards: an evidence-based analysis. **EcoHealth.**, v. 2, p. 26–37, 2005.

RAMOS, R. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitol. Res.**, v.107, n. 5, p.1115-1120, 2010.

REIS, A.B. et al. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, n. 3-4, p.173-185, 2005.

\_\_\_\_\_ Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006.

\_\_\_\_\_ Sys-temic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 87–95, 2009.

REINE, N.J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clin Tech Small Anim Pract.**, v.19, n.2, p.68-74, 2004.

REITHINGER, R. et al. Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania (Viannia)* species. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 141–145, 2003.

RENÉ-MARTELLET, M. et al. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasit. Vectors.**, v. 6., p. 1-3, 2015. Disponível em [http://doi: 10.1186/s13071-014-0613-4](http://doi:10.1186/s13071-014-0613-4).

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2001.

RIKIHISA, Y.S. et al. Analysis of *Ehrlichia canis* and a canine granulocyte *Ehrlichia* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 143–148, 1992.

RISTIC, M. et al. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infect. Immun.**, v. 6, p. 226–231, 1972.

ROAT, T. B.M. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front Immunol.**, v. 13, p. 120, 2014.

RODRIGUES, C.A.T. et al. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 197–205, 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 191, p. 363–366, 2013.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.4, p. e584, 2010.

RUDOLER, N. et al. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. **Vaccine**, p.8, 2012.

SAITO, T.B et al. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 1, p. 102–108, 2008.

SAEED, A.M. et al. Serum erythropoietin concentration in anaemia of visceral leishmaniasis (kala-azar) before and during antimonial therapy. **Br. J. Haematol.**, v.100, p.720–724, 1998.

SANTAMARIA, et al. Molecular Diagnosis and Species Identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections in Dogs from Panama, Central America. **Vector-Borne Zoonot. Dis.**, v. 14, n. 5, 2014. Disponível em <http://doi:10.1089/vbz.2013.1488>

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

SANTARÉM, V.A.; LAPOSY, C.B.; FARIAS, M.R. Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Colloquium Agrar.**, v. 1, n. 2, p. 60-66, 2005. doi: 10.5747/ca.2005.v01.n2.a015

SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, **Brazil. Vet. J.**, v.179, p. 145-148, 2009.

- SCHAEFER, J.J. et al. Antibiotic clearance of *Ehrlichia canis* from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1149, p. 263-269, 2008
- SCHUBACH, E.Y.; FIGUEIREDO, F.B.; ROMERO, G.A. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 108, n. 9, p. 568-74, 2014. doi:10.1093/trstmh/tru109
- SHAW, J.J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New world In: KILLICK-KENDRICK R.; PETERS, W. (Eds). **The Leishmaniasis is Biology and Medicine**. Academic Press, 1987. p.1-120.
- SKOTARCZAK, B. Canine ehrlichiosis. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v.10, n. 2, p. 137-141, 2003.
- SILVA, J.N. et al. Seroprevalence anti-Ehrlichia canis antibodies in dogs of Cuiabá, Mato Grosso. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 2, p.108-111, 2010.
- SILVA, A.B. et al. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. **Gac. Méd. México.**, v. 150, p. 171-174, 2014.
- SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.R.; HUXSOLL, D.L. Development of Ehrlichia canis, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick Rhipicephalus sanguineus and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **Am J Vet Res.**, v.37, n.2, p.119-26, 1976.
- SOUZA, B.M. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 2, p.89-93, 2010.
- SPOLIDORIO, M.G. et al. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 2, p.214-219, 2013. doi: 10.1590/S1984-29612013005000023.
- STEVENS, T.L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, p. 255-258, 1988.
- STICH, R.W. et al. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, v. 158, p. 256-273, 2008.
- SUKSAWAT, J.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v.14, p. 50-55, 2000.
- SUKSAWAT, J. et al. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S Ribosomal DNA secondary Structure. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 90-93, 2001.
- TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine Responses in Dogs Infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma Strain. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1063, p. 429-432, 2005.

- TAJIMA, T.; WADA, M. Inhibitory effect of interferon gamma on frequency of Ehrlichia canis-infected cells in vitro. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 156, n. 3-4, p.200-204, 2013. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.09.014.
- TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, p.287–292,1995.
- THEODOROU, K. et al.Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, n. 7, p. 1619-1626, 2013. doi: 10.1093/jac/dkt053.
- TORRES, H.M. et al. Isolamento e propagação da Ehrlichia canis em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, p. 77-82, 2002.
- TROPIA DE ABREU, R. et al. Influence of clinical status and parasiteloading on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.
- TROY, G.C.; FORRESTER S.D. Canine Ehrlichiosis, In: GREENE, C.E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. WB Saunders Co, Philadelphia, 1990. p. 404–414.
- UENO, T.E. et al. Ehrlichia canis in dogs attended in a veterinary hospital from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.
- UNVER, A. et al. Molecular and antigenic comparison of Ehrlichia canis isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2788-2793, 2001.
- UNVER, A.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1078, p.482–486, 2006.
- VIGNALI, D.A.A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 243, p. 243–255, 2000.
- VILLAESCUSA, A. et al. Evaluation of lymphocyte populations in dogs naturally infected by Ehrlichia canis with and without clinical signs. **Ticks and Tick-borne Dis.**, v. 3, p. 278– 281, 2012.
- VON ZUBEN, A.P. et al. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 3, p. 385-388, 2014 .
- VIEIRA, T.S. *et al.* Serosurvey of tickborne pathogens in dogs from urban and rural areas from Paraná State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p.104-109, 2013.
- WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 48, p. 177-182, 1995.
- WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 69, p. 307-317,1997.

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

WELLMAN, M.L. et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 24, p. 223–229, 1988.

WEN, B. et al. *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 250–254, 1995.

WEN, B. et al. Comparison of nested pcr with immunofluorescent-antibody assay for detection of *ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, p.1852–1855, 1997.

WERNECK, G.L. et al. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, 2014. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003172.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 21, n. 1, p.75-98, 1991. Jan;21(1):75-98.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva. March 22–26, 2010. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, v. 949, p.1–186, 2010.

YAGER, E. et al. Essential role for humoral immunity during Ehrlichia infection in immunocompetent mice. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 8009–8016, 2005.

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

ZWEYGARTH, E. et al. In vitro Culture of a Novel Genotype of Ehrlichia sp. from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, Suppl. 2, p. 86–92, 2013.

