

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ



ÁQUILA RHANÁ FAGUNDES FERRAZ

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E *Babesia vogeli*, E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma
gondii* EM CÃES PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE CÂNDIDO SALES-BA
E MICRORREGIÃO**

ILHÉUS – BAHIA

2021

ÁQUILA RHANÁ FAGUNDES FERRAZ

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E *Babesia vogeli*, E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma
gondii* EM CÃES PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE CÂNDIDO SALES-BA
E MICRORREGIÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Lessa Silva

ILHÉUS – BAHIA

2021

F381 Ferraz, Áquila Rhaná Fagundes.
Diagnóstico molecular de Ehrlichia canis e babesia vogeli, e diagnóstico sorológico de Neospora caninum e toxoplasma gondii em cães provenientes do município de Cândido Sales-BA e microrregião / Áquila Rhaná Fagundes Ferraz. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.
vii, 77 f. : il. ; anexo.

Orientadora: Fabiana Lessa Silva.
Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências e apêndices.

1. Cães – Doenças. 2. Toxoplasmose em animais. 3. Epidemiologia. 4. Babesiose. I. Título.

CDD 636.70896

ÁQUILA RHANÁ FAGUNDES FERRAZ

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E *Babesia vogeli*, E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma
gondii* EM CÃES PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE CÂNDIDO SALES-BA
E MICRORREGIÃO**

Ilhéus – BA, 23/04/2021

Fabiana Lessa Silva – *DSc*
UESC/DCAA
(Orientadora)

Paula Elisa Brandão Guedes - *DSc*
UESC/DCAA

Luciana Carvalho Lacerda - *DSc*
Célula – Laboratório Veterinário

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial meus pais Geovane Barros Ferraz e Juciara Santos Fagundes Ferraz.

Esta vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir viver esta experiência, por ser meu sustento e amparo, minha força e maior fonte de esperança e paz mesmo em meio a tantas tribulações e dificuldades. Hoje posso dizer com muita propriedade e certeza que se cheguei até este momento foi porque “até aqui me ajudou o Senhor!” (I Samuel 7:12).

Aos meus pais Geovane e Juciara por tanto amor, tantas orações, apoio incondicional e envolvimento direto na realização deste trabalho. Ao meu irmão Cainan pela companhia e auxílio quando mais precisei.

Aos meus avós Maria Eugenia e Alfredo pelo acolhimento, cuidado, intercessão e amor. A toda minha família, pela torcida e por tantas palavras de incentivo, especialmente minha tia Rosângela e minha prima Evellin. Destaco também a minha avó Maria de Lourdes, que apesar de nestes últimos anos não poder mais acompanhar meu processo devido sua doença neurodegenerativa, sempre esteve intercedendo pelos meus sonhos e comemorando cada conquista. Certamente esta realização também é fruto de seus momentos de intercessão em favor da minha vida.

À professora Fabiana Lessa pela orientação e conselhos desde a graduação, por sempre acreditar em mim, me trazer tantos desafios e me fazer acreditar em meu potencial.

Ao professor Alexandre Munhoz por tanta atenção, paciência, auxílio e colaboração.

À Gabriela Mota e Jeane Cordeiro. Sem vocês certamente não seria possível a finalização deste trabalho. Sou totalmente grata pela disposição, companhia, ensinamentos e incentivo de vocês. Ao Philipe de Oliveira, Hellen Ferraz e Lília Alves por tanta colaboração e paciência.

A todos os meus colegas do PPGCA-UESC e equipe do laboratório de Patologia Veterinária bem como os alunos de Iniciação Científica, pelo companheirismo e troca de experiências, especialmente os que estiveram comigo nas etapas finais, como a Gisele Dias, Adriana Lopes, Jamille Carvalho, entre tantos outros que colaboraram com todo o processo, como a Georgia Galaes. Aos meus amigos pessoais que me apoiaram nos momentos mais difíceis. Obrigada por tanta compreensão, carinho e acolhimento. Vocês me trouxeram leveza e força para continuar.

Aos funcionários do HV-UESC pelo apoio e atenção, em especial Ivo Arouca, Maria Fabiana e Eliege, assim como toda a equipe da limpeza e vigilância.

À banca examinadora representada por Paula Guedes e Luciana Lacerda pela disposição em contribuir com este trabalho.

Aos animais que fizeram parte deste estudo e seus tutores pela total confiança e colaboração.

A todos os docentes do PPGCA-UESC por tantos ensinamentos. À Capes pelo auxílio financeiro.

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E *Babesia vogeli*, E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma
gondii* EM CÃES PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE CÂNDIDO SALES-BA
E MICRORREGIÃO**

RESUMO

Os cães domésticos estão sujeitos a uma variedade de agentes infecciosos. Toxoplasmose, neosporose, erliquiose monocítica e babesiose são doenças que causam importantes alterações orgânicas nesses animais. Potencial zoonótico é também descrito para alguns desses agentes, como *T. gondii* e *E. canis*. O conhecimento do comportamento e prevalência desses patógenos favorece a adoção de medidas estratégicas eficazes para seu controle e prevenção. Até o momento existem poucos estudos na Bahia sobre a prevalência de infecção por *T. gondii*, *N. caninum*, *E. canis* e *B. canis vogeli* em cães, principalmente na mesorregião centro-sul do estado, onde não há nenhum estudo. Objetivou-se avaliar a ocorrência da infecção por esses agentes na região de Cândido Sales – BA. Foram incluídos no estudo 131 cães domésticos domiciliados e semi-domiciliados provenientes da zona urbana e rural da região. Inicialmente, foram obtidas informações junto aos tutores sobre o histórico e manejo dos animais, bem como sobre queixas clínicas eventuais a fim de verificar os fatores de risco/queixas clínicas associados às infecções. Foram coletadas amostras de sangue de cada animal, o qual foi dispensado em dois tubos, um com anticoagulante para posterior extração de DNA e diagnóstico molecular, e o outro com ativador de coágulo para obtenção do soro e realização do diagnóstico sorológico. A técnica de nested-PCR foi utilizada para detecção de *E. canis* e a PCR convencional para *B. canis vogeli*, enquanto as infecções por *T. gondii* e *N. caninum* foram determinadas pela técnica de RIFI. Adicionalmente foram confeccionados esfregaços sanguíneos para realização de diagnóstico parasitológico de *E. canis* e *B. canis vogeli*. A prevalência de infecção por *N. caninum* foi de 70,2%, de 67,9% para *T. gondii* e 37,4% para *E. canis*. Nenhum cão avaliado foi positivo para *B. canis vogeli*. O diagnóstico parasitológico identificou mórulas de *Ehrlichia spp.* em dois cães e piroplasma em um cão. A idade (acima 3 anos) foi considerada como fator de risco para as infecções por *E. canis* ($p=0,0079$) e *N. caninum* ($p=0,0042$). Além disso, o habitat (rural) foi considerado fator de risco para infecção por *N. caninum* ($p=0,0046$). As coinfeções foram frequentes, principalmente por *N. caninum* e *T. gondii*, que foram diagnosticadas em 45,03% dos cães. A ocorrência de infecção por *E. canis* se mostrou significativa para o favorecimento da infecção por *N. caninum* ($p=0,0014$) e *T. gondii* ($p=0,025$). Queixas clínicas foram descritas em apenas 27,48% dos animais. Sugere-se que sejam realizados estudos com um maior número de animais para que sejam elucidados os fatores de risco especialmente para infecções por *T. gondii*, e para confirmar a ausência da infecção por *B. vogeli* nos cães da região de Cândido Sales-BA.

Palavras-chave: Babesiose. Epidemiologia. Erliquiose. Neosporose. Toxoplasmose.

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E *Babesia vogeli*, E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma
gondii* EM CÃES PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE CÂNDIDO SALES-BA
E MICRORREGIÃO**

ABSTRACT

Domestic dogs are subject to a variety of infectious agents. Toxoplasmosis, neosporosis, monocytic ehrlichiosis and babesiosis are diseases that cause important organic changes in these animals. Zoonotic potential is also described for some of these agents, such as *T. gondii* and *E. canis*. The knowledge of the behavior and prevalence of these pathogens favors the adoption of effective strategic measures for their control and prevention. To date, there are few studies in Bahia on the prevalence of infection by *T. gondii*, *N. caninum*, *E. canis* and *B. canis vogeli* in dogs, mainly in the central-southern mesoregion of the state, where there is no study. The objective was to evaluate the occurrence of infection by these agents in the region of Cândido Sales - BA. The study included 131 domesticated and semi-domesticated domestic dogs from the urban and rural areas of the region. Initially, information was obtained from the tutors about the history and management of the animals, as well as about eventual clinical complaints in order to verify the risk factors / clinical complaints associated with the infections. Blood samples were collected from each animal, which was dispensed in two tubes, one with anticoagulant for subsequent DNA extraction and molecular diagnosis, and another tube with clot activator to obtain the serum and perform the serological diagnosis. The nested-PCR technique was used to detect *E. canis* and the conventional PCR for *B. canis vogeli*, while infection by *T. gondii* and *N. caninum* were determined by the RIFI technique. Additionally, blood smears were made to carry out a parasitological diagnosis of *E. canis* and *B. canis vogeli*. The prevalence of infection by *N. caninum* was 70.2%, 67.9% for *T. gondii* and 37.4% for *E. canis*. No dogs evaluated were positive for *B. canis vogeli*. The parasitological diagnosis identified morulae of *Ehrlichia spp.* in two dogs and piroplasma in one dog. Age (above 3 years) was considered a risk factor for infections by *E. canis* ($p = 0.0079$) and *N. caninum* ($p = 0.0042$). In addition, the habitat (rural) was considered a risk factor for infection by *N. caninum* ($p = 0.0046$). Coinfections were frequent, mainly by *N. caninum* and *T. gondii*, which were diagnosed in 45.03% of the dogs. The occurrence of infection by *E. canis* proved to be significant in favor of infection by *N. caninum* ($p = 0.0014$) and *T. gondii* ($p = 0.025$). Clinical complaints were described in only 27.48% of the animals. It is suggested that studies be carried out with a larger number of animals in order to elucidate the risk factors especially for infections by *T. gondii*, and to confirm the absence of infection by *B. vogeli* in dogs in the region of Cândido Sales-BA.

Keywords: Babesiosis. Epidemiology. Ehrlichiosis. Neosporosis. Toxoplasmosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico do *T. gondii*. 15
- Figura 2.** Ciclo biológico de *N. caninum*. 23
- Figura 3.** A – Mapa da região sudoeste da Bahia. B – Mapa de Cândido Sales-BA, evidenciando (seta) a localização e proximidade do distrito de Cercadinho (Vitória da Conquista-BA). 40
- Figura 4.** Fotomicrografia de esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido em aumento de 100X evidenciando (setas): A- Mórula de *Ehrlichia spp.*; B- *Hepatozoon spp.*; C- Piroplasma; D- Corpúsculo de Lentz. 45
- Figura 5.** Leitura da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em microscópio de epifluorescência a partir de lâminas marcadas com isotiocianato de fluoresceína. A: Amostra positiva para *Neospora caninum*; B: amostra negativa para *Neospora caninum*. 45
- Figura 6.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2,0%, com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®). A: amplicómeros da nested PCR para *E. canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN/HE3. Canaleta 1: marcador de peso molecular em escala 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), canaleta 2: controle positivo (396 pb), canaleta 3: controle negativo, canaletas 4, 5, 7,8, 9 e 11: amostras positivas, canaletas 6, 10, 12, 13: amostras negativas. B: amplicómeros da PCR para *B. vogeli* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CAN 626R/CAN 172F. Canaleta 1: marcador peso molecular em escala 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), canaleta 2: controle positivo (450 pb), canaleta 3: controle negativo, canaletas 4 a 12: amostras negativas. 46
- Figura 7.** Coinfecções por *E. canis*, *N. caninum* e *T. gondii* em cães da região de Cândido Sales-BA, considerando-se os resultados obtidos no diagnóstico sorológico e molecular. 47

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Estudos de prevalência de <i>T. gondii</i> em cães de diversos estados brasileiros.	17
Tabela 2. Estudos de prevalência de <i>N. caninum</i> em cães de diversos estados brasileiros.	24
Tabela 3. Estudos de prevalência de infecção por <i>E. canis</i> em cães de diversos estados brasileiros.	30
Tabela 4. Estudos de prevalência de <i>B. canis vogeli</i> em cães de diversos estados brasileiros.	37
Tabela 5. Queixas clínicas relatadas pelos proprietários dos cães incluídos no estudo.	48
Tabela 6. Queixas clínicas nos cães positivos para <i>E. canis</i> pela técnica molecular.	49
Tabela 7. Queixas clínicas descritas em animais positivos para <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> .	49
Tabela 8a. Fatores associados à infecção pela <i>E. canis</i> em cães positivos.	50
Tabela 8b. Associação entre cães positivos para <i>E. canis</i> e a variável idade.	51
Tabela 9a. Fatores associados à infecção pela <i>N. caninum</i> em cães positivos.	51
Tabela 9b. Associação entre cães positivos para <i>N. caninum</i> e as variáveis idade e habitat.	52
Tabela 10. Fatores associados à infecção pela <i>T. gondii</i> em cães positivos.	52

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivo Especifico	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	13
3.1.1. Hospedeiros.....	13
3.1.2. Ciclo de vida e transmissão.....	14
3.1.3. Sinais Clínicos.....	15
3.1.4. Epidemiologia e fatores de risco.....	16
3.1.5. Diagnóstico.....	18
3.1.5.1. Diagnóstico Sorológico.....	19
3.1.5.2. Parasitológico e biológico.....	20
3.1.5.3. Molecular.....	20
3.2. <i>Neospora caninum</i>	21
3.2.1. Hospedeiros.....	21
3.2.2. Ciclo de vida e transmissão.....	21
3.2.3. Sinais Clínicos.....	23
3.2.4. Epidemiologia e fatores de risco.....	24
3.2.5. Diagnóstico.....	26
3.2.5.1. Sorológico.....	26
3.2.5.2. Parasitológico.....	26
3.2.5.3. Molecular.....	27
3.3. <i>Ehrlichia canis</i>	27
3.3.1. Vetor, ciclo e transmissão.....	28
3.3.2. Sinais clínicos.....	29
3.3.3. Epidemiologia e fatores de risco	29
3.3.4. Diagnóstico	32
3.3.4.1. Parasitológico	32
3.3.4.2. Sorológico	33
3.3.4.3. Molecular	33
3.4. <i>Babesia canis vogeli</i>	34
3.4.1. Vetor, Ciclo e transmissão.....	35

3.4.2. Sinais clínicos	36
3.4.3. Epidemiologia e fatores de risco.....	36
3.4.4. Diagnóstico.....	38
3.4.4.1. Parasitológico.....	39
3.4.4.2. Molecular.....	39
3.4.4.3. Sorológico	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Área de estudo	40
4.2. Aspectos éticos.....	41
4.3. Animais e obtenção de amostras biológicas.....	41
4.4. Pesquisa de hemoparasitas.....	41
4.5. Diagnóstico sorológico de infecção por <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	42
4.6. Diagnóstico molecular de infecção por <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia canis vogeli</i>	42
4.6.1. Extração de DNA.....	42
4.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.7. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	44
5.1. Diagnóstico parasitológico	44
5.2. Diagnóstico sorológico e molecular.....	45
5.3. Coinfecções.....	46
5.4. Queixas clínicas	48
5.4.1. Queixas clínicas associadas ao diagnóstico	48
5.6. Fatores de risco	50
6. DISCUSSÃO	53
6.1. Diagnóstico parasitológico.....	53
6.2. Diagnóstico molecular.....	53
6.3. Diagnóstico sorológico.....	55
6.4. Coinfecções.....	55
6.5. Queixas clínicas associadas ao diagnóstico.....	56
6.6. Fatores de risco.....	58
7. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE I	75
APÊNDICE II	76
ANEXO I	77

1. INTRODUÇÃO

Cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) são importantes para atividades humanas e, por muitas vezes, constituem-se como membros de suas famílias, sendo reconhecida uma íntima relação entre estas espécies (LOPES; SILVA, 2012). Estes animais, no entanto, podem ser infectados por uma considerável variedade de patógenos, que causam importantes alterações orgânicas. Em alguns casos, podem ainda apresentar risco de transmissão para os seres humanos devido ao potencial zoonótico de alguns destes agentes infecciosos (COELHO et al., 2013).

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum*, ambos protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, são parasitas intracelulares obrigatórios de grande importância na medicina veterinária e que possuem distribuição geográfica ampla, estando presentes em diversas partes do mundo. (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Cães, assim como seres humanos e outras diversas espécies, são considerados hospedeiros intermediários do *T. gondii*, e nestes a infecção pode ocorrer de forma assintomática ou com apresentação clínica importante, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. A avaliação da soroprevalência deste agente na espécie canina possui grande importância, pois o diagnóstico nestes animais pode evidenciar a contaminação ambiental e humana (RATZLAFF et al., 2018).

Já no caso da neosporose, cães atuam como hospedeiros definitivos e podem manifestar diversos sinais clínicos, principalmente neuromusculares e em áreas com a presença de bovinos, podem transmitir o agente para essa espécie, podendo levar a importantes prejuízos econômicos visto que, em vacas, a infecção por *N. caninum* está relacionada principalmente a episódios de aborto (DUBEY, 2003).

Doenças transmitidas por carrapatos por sua vez, também apresentam grande importância na sociedade devido ao crescente deslocamento de animais de estimação e à grande capacidade adaptativa de algumas espécies de carrapatos a diversas situações climáticas (SHAW et al., 2001). Destaca-se que uma mesma espécie de carrapato pode transmitir diversos patógenos, favorecendo a presença de coinfeções nos animais (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; FAUSTINO, 2004).

Dentre os diversos hemoparasitas transmitidos por carrapatos no Brasil, destacam-se a *B. canis vogeli* e a *E. canis* (VILELA, 2012). A transmissão de ambos ocorre, principalmente, através do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; FAUSTINO, 2004). A ocorrência dessas doenças em cães do Brasil é superior ao que se observa em países de clima temperado, uma vez que o clima tropical brasileiro favorece o ciclo de vida do vetor (SHAW, 2001; PRADO, 2014;

SOARES et al., 2017). A grande proximidade do cão com o homem pode ainda favorecer a transmissão de agentes comuns entre as duas espécies, como *E. canis* e outros hemoparasitas (ROZENTAL et al., 2002; STICH et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

São descritas diversas coinfeções em cães, que podem levar a agravos clínicos, sendo comuns em áreas onde há ocorrência de vários agentes etiológicos de forma concomitante (COELHO et al., 2013). É de grande importância que sejam realizados estudos epidemiológicos relacionados a estes patógenos devido à crescente ligação entre a espécie canina e os seres humanos, a fim de que sejam estabelecidos melhores cuidados e ações estratégicas para prevenção de determinadas zoonoses e outras doenças importantes para a sanidade animal (RATZLAFF et al., 2018).

Até o momento existem poucos estudos na Bahia sobre a prevalência de infecção por *T. gondii*, *N. caninum*, *E. canis* e *B. vogeli* em cães, principalmente na mesorregião centro-sul do estado, onde não há nenhum estudo. Dessa forma, objetivou-se avaliar a frequência da infecção por esses agentes na região de Cândido Sales – BA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Verificar a ocorrência de cães naturalmente infectados por *N. caninum*, *T. gondii*, *B. vogeli* e *E. canis* provenientes da zona rural e da zona urbana da região de Cândido Sales, no centro-sul da Bahia.

2.2 Objetivos específicos:

- i) Verificar a ocorrência de coinfeção entre *B. vogeli*, *E. canis*, *T. gondii* e *N. caninum* em cães provenientes da zona rural e da zona urbana da região de Cândido Sales, no centro-sul da Bahia;
- ii) Verificar os fatores de risco associados às infecções por *B. vogeli*, *E. canis*, *T. gondii* e *N. caninum* em cães na região de Cândido Sales-BA;
- iii) Verificar as queixas clínicas associadas às infecções por *B. vogeli*, *E. canis*, *T. gondii* e *N. caninum* em cães na região de Cândido Sales-BA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e à subclasse Coccidia. Foi descrito pela primeira vez em 1908 na Tunísia (Norte da África) por Nicolle e Manceaux em um roedor e, no mesmo ano, foi descrito no Brasil (São Paulo) por Splendore, que identificou a presença do parasito em um coelho (GOMES, 1970). Esse agente é conhecido em diversas partes do mundo e, devido ao seu potencial zoonótico, possui grande importância tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Os cães são considerados animais sentinelas para avaliação da contaminação ambiental e humana pelo *T. gondii* (ULLMANN et al., 2008; LEAL; COELHO, 2014; CUNHA et al., 2016; PAZ et al., 2019). O monitoramento desses animais favorece a adoção de medidas eficientes de saúde pública para o controle dessa zoonose (ULLMANN et al., 2008; LEAL; COELHO, 2014; CUNHA et al., 2016; PAZ et al., 2019).

3.1.1 Hospedeiros

Os felinos domésticos e silvestres são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, sendo que o gato doméstico possui grande importância epidemiológica na toxoplasmose humana (SOUZA et al., 2010). Os hospedeiros intermediários são os animais homeotérmicos (mamíferos e aves) (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Na população humana, *T. gondii* é reconhecido como um importante patógeno oportunista, podendo afetar principalmente fetos de mães com infecção recente e pacientes imunodeprimidos, sendo que nestes indivíduos a morbidade e mortalidade são elevadas. Em grande parte dos adultos a toxoplasmose se apresenta de forma assintomática e, em alguns casos, pode levar à cegueira. Em crianças congenitamente infectadas, pode haver retardo mental. (CARSTEN et al., 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

3.1.2 Ciclo de vida e transmissão

O ciclo de transmissão do *T. gondii* é heteroxeno facultativo (TENTER et al., 2000) e sua fase sexuada ocorre apenas nos hospedeiros definitivos (felídeos) (Figura 1). São descritas três formas infectantes do parasito: taquizoítos, que apresentam uma multiplicação rápida, indicando a fase aguda da infecção; bradizoítos, que possuem uma multiplicação lenta e se encontram dentro dos cistos teciduais; e os esporocistos, que se encontram no centro dos oocistos (SOUZA et al., 2010).

O início do ciclo ocorre após a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos pelos hospedeiros definitivos. Estes cistos podem ser encontrados em carne crua ou carcaças de animais infectados. A partir da liberação dos bradizoítos devido à ação de enzimas digestivas, ocorrem diversos ciclos de replicação assexuada do parasito no interior dos enterócitos do hospedeiro definitivo na forma de taquizoítos, com posterior reprodução sexuada, que resulta na produção de oocistos, os quais são eliminados através das fezes durante a fase aguda da infecção (LEAL; COELHO, 2014). Podem ser liberados até milhões de oocistos não esporulados nas fezes durante cerca de 7 a 21 dias, infectando o ambiente (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A esporulação dos oocistos ocorre no ambiente após o 1º ao 5º dia após sua liberação, e depende de condições favoráveis de temperatura, umidade e arejamento. Os oocistos esporulados contêm 2 esporocistos com 4 esporozoítos no interior de cada esporocisto. Estes podem ser eventualmente ingeridos por hospedeiros intermediários através de alimentos ou água contaminados (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Logo após a ingestão, os esporozoítos são liberados no aparelho digestivo dos hospedeiros intermediários, infectando os enterócitos e dando origem aos taquizoítos, responsáveis pela fase aguda da infecção (SOUZA et al., 2010).

Os taquizoítos sofrem rápida multiplicação e penetram ativamente nas células do hospedeiro, levando à morte celular e/ou invasão de células vizinhas devido ao rompimento das células infectadas, ocorrendo assim liberação dos taquizoítos na corrente sanguínea. Este comportamento favorece a disseminação do agente por diversos tecidos do corpo, especialmente musculatura esquelética e cardíaca, sistema nervoso central, placenta e/ou olhos, levando a variadas manifestações clínicas devido à destruição tecidual e resposta inflamatória ocasionada pela presença do agente (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Em seguida, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, com posterior formação dos cistos. Os bradizoítos são morfológicamente idênticos aos taquizoítos, porém, apresentam multiplicação e metabolismo mais lentos. Nessa forma, podem

persistir dentro dos cistos por toda a vida do hospedeiro sem ocasionar uma resposta inflamatória. Os cistos teciduais podem ser encontrados em diversos tecidos dos hospedeiros intermediários (músculos esqueléticos e cardíaco e/ou cérebro) e contêm milhares de bradizoítos. Eventualmente, pode haver liberação dos bradizoítos dos cistos, ocorrendo uma nova transformação em taquizoítos, o que leva a agravamento da infecção, principalmente em hospedeiros imunodeprimidos. Os cistos teciduais podem infectar tanto hospedeiros intermediários quanto definitivos (MONTROYA e LIESENFELD 2004).

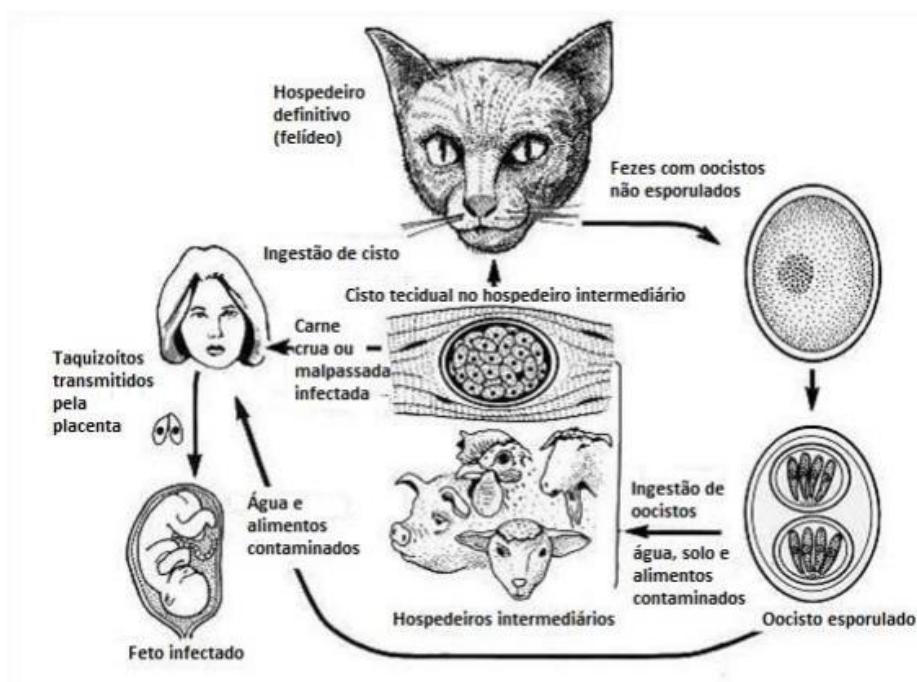


Figura 1. Ciclo biológico do *T. gondii*.

Fonte: Adaptado de Dubey (2004).

3.1.3 Sinais clínicos

Assim como no homem, em cães a manifestação clínica da toxoplasmose também possui caráter oportunista e ocorre geralmente de forma secundária, após infecções por agentes imunossupressores como o vírus da cinomose, hepatite viral canina e até mesmo em casos de erliquiose canina (MORETTI et al., 2002; DUBEY et al., 2003; DIAS; FREIRE, 2005; HEADLEY et al., 2013; GIRARDI et al., 2014). Os sinais clínicos podem ser inespecíficos ou comuns a outras doenças, como brucelose, leishmaniose, cinomose (FERREIRA et al., 2016) e neosporose (DUBEY; LAPPIN 2006; DUBEY, 2010).

De maneira geral, as infecções por *T. gondii* podem envolver órgãos de vários sistemas orgânicos tais como nervoso, reprodutivo, digestório, respiratório, oftalmológico, muscular, hematopoiético, hepático e/ou cardiovascular (MINEO et al., 2004; SILVA et al., 2005; GALVÃO et al., 2014). Quadros neurológicos têm grande importância nas infecções em cães, e as manifestações clínicas dependem da localização do parasito no cérebro, cerebelo e/ou medula espinhal (DUBEY; LAPPIN, 2006). Convulsões, ataxia, tremores, paresia/paralisia e déficit de nervos cranianos podem ocorrer devido a encefalomielite (GROVES et al., 2004).

Diversas alterações oftalmológicas são descritas na literatura, especialmente uveíte (LEAL; COELHO, 2014). A ocorrência de pneumonia necrosante aguda também é descrita em cães com toxoplasmose e pode levar a quadros de dispneia progressiva (DUBEY; LAPPIN, 2006). Miosite pode levar a quadros de hiperestesia, marcha rígida e atrofia muscular. Quadros de miocardite podem ocasionar arritmias cardíacas ou insuficiência cardíaca. Pode ainda ocorrer anorexia, vômitos, diarreia, icterícia, ascite e pancreatite devido ao acometimento hepático e/ou do trato digestório (GROVES et al., 2004).

3.1.4 Epidemiologia e fatores de risco

Diversos estudos epidemiológicos da toxoplasmose em cães foram realizados no mundo e em várias regiões do Brasil. No nosso país, a soroprevalência descrita variou de 11,5% (DANTAS et al., 2013) a 79,57% (TEIXEIRA, 2008) entre os anos de 2001 e 2019 (Tabela1).

Tabela 1. Estudos de prevalência de *T. gondii* em cães de diversos estados brasileiros.

Técnica	Prevalência	N	Cidade - Estado/tipo de população	Referência
RIFI	63,55%	143/225	Salvador – Bahia / CCZ.	Barbosa et al., 2003
RIFI	76,40%	120/157	Monte negro – Rondônia / zona urbana.	Canón-Franco et al., 2004
RIFI	45,1%	129/286	Campina Grande – Paraíba / zona urbana e rural.	Azevedo et al., 2005
RIFI	20,8%	5/24	Guarapuava – Paraná / fazenda.	Romanelli et al., 2007
RIFI	56%	56/100	Botucatu – São Paulo / zona urbana.	Camossi et al., 2008
RIFI	57,6%	97/170	Pernambuco / domiciliados.	Figueredo et al., 2008

RIFI	79,57%	74/93	Maranhão / zona rural.	Teixeira, 2008
RIFI	60,7%	132/218	Lavras – MG / clínicas veterinárias.	Guimarães, 2009
RIFI	22,3%	89/400	Cidades de Lages e Balneário Camboriú - Santa Catarina.	Moura et al., 2009
RIFI	69,8%	90/120	Pará / zona rural e não domiciliados.	Valadas et al., 2010
RIFI	20, 8%	63/302	Botucatu – São Paulo / zona urbana.	Coiro et al., 2011
RIFI	18%	95/530	Região de Teresina - Piauí / zona urbana.	Lopes et al., 2011
RIFI	50,89%	57/112	Londrina – Paraná (HV).	Zulpo et al., 2012
RIFI	11,5%	55/476	Natal - Rio Grande do Norte / Hospital Veterinário.	Dantas et al., 2013
RIFI	15,6%	27/173	Patos – Paraíba / Hospital Veterinário.	Dantas et al., 2014
RIFI	21%	144/689	Botucatu – São Paulo / zona rural.	Gaio et al., 2014
RIFI	55,1%	314/570	Ibiúna – São Paulo.	Mascolli et al., 2015
RIFI	47,05%	77/187	Espírito Santo / zona rural.	Acosta et al., 2016
RIFI	43,31%	259/598	Londrina / Hospital veterinário, cães com sinais clínicos.	Ferreira et al., 2016
RIFI	43,1%	107/248	Rio Cuiabá – Mato Grosso /comunidade ribeirinha.	Rodrigues et al. 2016
RIFI	40,8%	144/353	Bahia.	Deiró et al., 2018
RIFI	22,1%	231/1.043	Paraíba.	Fernandes et al., 2018a
RIFI	18%	36/200	Sertão da Paraíba.	Fernandes et al., 2018b
RIFI	43,5%	34/78	Região central - Rio Grande do sul / Hospital veterinário.	Ratzlaf et al., 2018
RIFI	44.3%	27/61	Ilhéus – Bahia / domiciliados.	Oliveira et al., 2019
RIFI	38,0%	100/263	Castanhal e Belém - Pará / domicílios e abrigos.	Paz et al., 2019
HAI	37,7%	154/255	Ilhéus – Bahia / urbanos domiciliados.	Carlos, 2010
HAI	32,5%	39/81	Itabuna – Bahia / urbanos domiciliados.	Carlos, 2010
MAT	34,3%	46/134	Paraná / zona rural.	Souza et al., 2003
MAT	19,7%	219/1110	São Paulo / zona urbana.	Souza et al., 2003
MAD	26%	78/300	Avaré – São Paulo / cães errantes.	Gonzalez et al., 2010
ELISA	30,30%	112/369	Uberlândia – MG / Hospital Veterinário e	Mineo et al., 2004

cães errantes.

IHA,IB, RIFI, ELISA,	36%	59/163	Uberlândia – MG / Hospital veterinário.	Mineo et al., 2001
----------------------------	-----	--------	---	--------------------

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; HAI: Teste de Hemaglutinação Indireta; MAD: Método de aglutinação direta modificado; MAT: Teste de aglutinação modificado; ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática; IB: Immunoblotting.

Alguns fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em cães já foram descritos por diversos pesquisadores, tais como convivência com gatos domésticos (RODRIGUES et al., 2016), ingestão de carne crua, presença de animais sinantrópicos no ambiente doméstico, acesso à rua (CAMOSSO et al., 2008), ingestão de dieta caseira, idade (MOURA et al., 2009; FÁBREGA et al., 2020), permanência em ambientes não cimentados (BRESCIANI et al., 2007) e não definição da raça (DANTAS et al., 2014).

A falta de saneamento básico, bem como acúmulo de resíduos de materiais biológicos e a presença de roedores também podem ser fatores de risco para infecção pelo *T. gondii*. Um solo limpo e o armazenamento adequado de alimentos podem levar à diminuição da prevalência da infecção (FERNANDES et al., 2018a).

3.1.5 Diagnóstico

Para um diagnóstico preciso da toxoplasmose, além da avaliação clínica, deve-se levar em consideração informações sobre o histórico do animal, e devem ser realizados exames complementares e específicos, especialmente com pesquisa de anticorpos circulantes (DUBEY; LAPPIN, 2006, DUBEY et al., 2007, DA ROCHA et al., 2012). É de grande importância que haja o conhecimento das diversas manifestações clínicas da doença, visto que essas são frequentemente negligenciadas ou não reconhecidas (LEAL; COELHO, 2014), inespecíficas ou semelhantes às presentes em outras enfermidades, como no caso das infecções por *N. caninum* (DUBEY; LAPPIN, 2006; DUBEY, 2010). Deve-se ainda levar em consideração a possibilidade de coinfeção com outras espécies de protozoários intracelulares e filogeneticamente próximos (FRESCHI et al., 2005).

Os achados laboratoriais geralmente apresentam alterações inespecíficas. De maneira geral, pode-se observar anemia, leucocitose ou leucopenia com neutropenia, linfopenia, eosinopenia e/ou monocitopenia. Aumento das enzimas hepáticas

(aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), hiperbilirrubinemia e hipoalbuminemia podem estar presentes devido acometimento hepático. A diminuição da relação albumina/globulina também está atrelada ao aumento das globulinas devido à estimulação da resposta humoral à infecção (LEAL; COELHO, 2014).

O diagnóstico preciso da infecção pelo *T. gondii* pode ser feito através de métodos sorológicos, histológicos, biológicos, moleculares ou pela combinação desses. Para escolha de um método específico, devem-se conhecer as vantagens e limitações de cada teste disponível (FRESCHI et al., 2005).

3.1.5.1 Sorológico

Dentre os métodos de diagnóstico disponíveis, os sorológicos geralmente são os mais simples e economicamente viáveis, sendo utilizados para detectar principalmente a produção de anticorpos IgG e/ou IgM anti-*T. gondii*. Devido ao fato dos anticorpos da classe IgG, permanecerem teoricamente por toda a vida do animal, eles são os mais utilizados para pesquisas epidemiológicas pois indicam exposição prévia ao *T. gondii* (COVRE, 2014). Podem ser utilizadas as seguintes técnicas: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Teste Imunoenzimático (ELISA), Teste Modificado de Aglutinação (MAT) (DUBEY, 2010), Hemaglutinação Indireta (HAI), dentre outras. A RIFI, no entanto, é o método mais utilizado, principalmente em grandes estudos epidemiológicos (BRESCIANI et al., 2008).

A RIFI é utilizada amplamente para diagnóstico e titulação de anticorpos, devido à sua elevada especificidade e sensibilidade, segurança e praticidade. Suas limitações incluem possíveis reações cruzadas com fatores reumatóides e anticorpos antinucleares, necessidade de um microscópio de imunofluorescência para realização da leitura, além da relativa subjetividade de leitura (DUBEY, 2010). Apesar de suas limitações, é considerada a técnica padrão ouro de diagnóstico sorológico devido à sua alta especificidade (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003).

O teste de ELISA também pode ser utilizado para detecção de anticorpos IgG e IgM. Neste ensaio, a reação antígeno-anticorpo ocorre após a adição de uma enzima ligada ao anticorpo. A reação pode ser avaliada objetivamente, pela quantificação da cor e, neste caso, muitos soros podem ser examinados de forma rápida e automatizada, utilizando um leitor de ELISA (DUBEY, 2010). A sensibilidade e a especificidade do teste são elevadas, variando de acordo com o tipo de antígeno utilizado (COVRE, 2014).

Métodos de aglutinação também podem ser utilizados, como o MAT, sendo alternativo à RIFI para triagem de infecções por *T. gondii* e apresenta boa

especificidade e sensibilidade, com técnica e leitura simples e precisas (ZHU et al., 2012). O HAI também é um método simples e prático, com boa sensibilidade e especificidade, porém, os resultados em infecções congênitas e em animais com titulação abaixo de 1:128 não são confiáveis (CAMARGO et al., 1986; DUBEY, 2010), não sendo muito utilizado atualmente, assim como outros testes sorológicos que caíram em desuso.

3.1.5.2 Parasitológico e biológico

Exames citopatológicos e histopatológicos, associados ou não à imunohistoquímica, podem ser utilizados como meios de detecção do *T. gondii* em amostras de tecidos de diversas espécies (DUBEY e LAPPIN 2006; DUBEY, 2010). O agente pode ser encontrado através da avaliação microscópica dos pulmões, fígado, baço, linfonodos e outros órgãos linfoides, musculatura esquelética, líquidos biológicos e secreções, podendo ser feita detecção até mesmo em lavados bronco-alveolares (BROWNLEE; SELTON, 2001).

Provas biológicas também podem ser utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose, a partir da inoculação de amostras biológicas do animal sob investigação em animais de laboratório, geralmente em camundongos. A técnica é eficiente, porém, necessita de tempo, além de adequada infraestrutura laboratorial (DUBEY et al., 2007; LEAL; COELHO, 2014).

3.1.5.3 Molecular

A detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) através de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) constitui importante ferramenta complementar para o diagnóstico das infecções por *T. gondii* (BRESCIANI et al., 2008), além de permitir estudos mais detalhados, como análises genotípicas (FUENTES et al., 2001). Por outro lado, a PCR só será positiva em casos de parasitemia, sendo eficaz apenas quando há disseminação ou passagem do parasito para o sangue, tal como ocorre na etapa aguda dessa parasitose (KOMPALIC-CRISTO; BRITTO; FERNANDES, 2005).

O Western Blotting (WB) pode ser utilizado de forma complementar a outros testes sorológicos. Apesar de permitir a análise de uma grande variedade de proteínas, não apresenta 100% de segurança no diagnóstico das infecções por *T. gondii* (FRESCHI et al., 2005). Nesta técnica, a amostra de soro testada reage com antígenos de *T. gondii* na membrana, onde ocorre a migração e marcação de acordo

com o peso molecular e padrões de bandas. Os resultados são comparados com pesos moleculares conhecidos, utilizados como controles (LEAL; COELHO, 2014).

3.2 *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário intracelular do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e subclasse Coccidia. Possui ampla distribuição geográfica e está presente em vários países do mundo (DUBEY, 2003). Este agente foi identificado pela primeira vez no ano de 1984 por Bjerkås et al. em cães com alterações neurológicas (encefalomielite) e musculares (miosite), sendo descrito com grande similaridade morfológica ao *T. gondii* (DUBEY, 2003).

3.2.1 Hospedeiros

Canídeos como cães domésticos (McALLISTER et al., 1998), coiotes (GONDIM et al., 2004) e dingos são descritos como importantes hospedeiros definitivos de *N. caninum* (KING et al., 2010), uma vez que nos indivíduos dessas espécies ocorre o desenvolvimento sexual do parasito e a eliminação de oocistos através das fezes (BENETTI et al., 2008; MELO; SILVA; AGUIAR, 2012).

Diversas espécies animais podem atuar como hospedeiros intermediários incluindo os próprios cães, ruminantes, equinos, cervos, ratos silvestres, raposas, felinos selvagens, guaxinins, javalis, lagomorfos, lobos, mamíferos marinhos, rinocerontes, roedores e veados (ÁLVARES-GARCÍA, 2003). Atualmente, a neosporose é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos, ocasionando perdas econômicas significativas (DUBEY, 2003).

3.2.2 Ciclo de vida e transmissão

O ciclo de transmissão do *N. caninum* é heteroxeno, com a reprodução sexuada ocorrendo nos hospedeiros definitivos e a reprodução assexuada nos hospedeiros intermediários (Figura 2). São descritas três formas evolutivas no ciclo de transmissão do *N. caninum*: taquizoítos, bradizoítos (ou cistos teciduais contendo bradizoítos) e oocistos com esporozoítos após a esporulação (MELO; SILVA; AGUIAR, 2012;). Os taquizoítos e os cistos teciduais ocorrem de forma intracelular nos hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2002).

Os taquizoítos se multiplicam rapidamente e possuem formato ovoide, semilunar ou globular, medindo aproximadamente 6 × 2 µm. Em contrapartida, os

cistos teciduais podem medir até cerca de 107µm de comprimento e possuem o formato oval a arredondado; sua parede geralmente tem até 4 µm de espessura, e envolve diversos bradizoítos. Os cistos teciduais são encontrados principalmente no sistema nervoso central (DUBEY, 2002; DUBEY, 2003).

Neospora caninum pode ser transmitido de forma horizontal, através da ingestão de oocistos esporulados encontrados no ambiente, ou pela ingestão de cistos teciduais por carnívoros. Pode ocorrer ainda a transmissão de forma vertical, através da infecção congênita (DIJKSTRA et al., 2001; DUBEY, 2003). A transmissão por via transplacentária tem grande importância principalmente para os bovinos, pois contribui para o aumento das perdas econômicas devido à persistência da infecção no rebanho. Cadelas infectadas de forma subclínica podem transmitir o parasito para seus fetos, e ninhadas posteriores podem nascer infectadas (DUBEY, 2003; CAVALCANTE, 2010).

A infecção dos hospedeiros definitivos ocorre após a ingestão de carcaças que contêm cistos teciduais. Após a ingestão, ao chegarem no estômago do hospedeiro, a parede dos cistos sofre degradação devido à ação das secreções gástricas, havendo liberação de bradizoítos, que então invadem as células da mucosa intestinal e se reproduzem no seu interior, levando à formação e liberação de oocistos não esporulados. A esporulação ocorre no ambiente, após 24 a 72 horas, e depende das condições de umidade, temperatura e oxigenação. Estes oocistos são morfológicamente semelhantes aos de *T. gondii* e *Hammondia hammondi*, com parede incolor englobando dois esporocistos. Cada esporocisto por sua vez contém quatro esporozoítos de formato alongado, com um resíduo (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2003; CAVALCANTE, 2010).

A infecção dos hospedeiros intermediários pode ocorrer de forma horizontal e/ou vertical, sendo a horizontal ocasionada geralmente pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com a presença de oocistos esporulados (DUBEY, 2003). A liberação dos esporozoítos ocorre no intestino. Após penetrarem na parede intestinal, os esporozoítos transformam-se em taquizoítos, os quais se dividem rapidamente por endodiogenia lesando as células e levando à disseminação da infecção por diversos tecidos, provocando uma reação inflamatória que pode induzir manifestação clínica na fase aguda da infecção. Em seguida, ocorre transformação dos taquizoítos em bradizoítos, com posterior formação de cistos teciduais (SILVA, 2006).

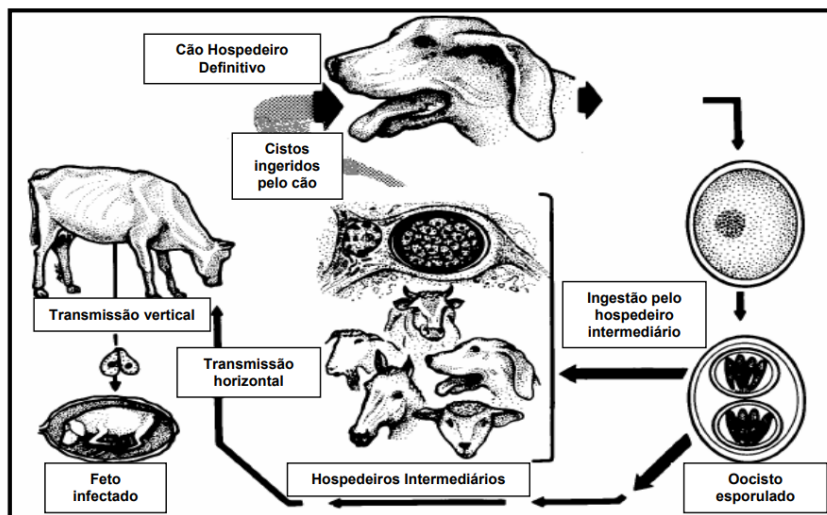


Figura 2: Ciclo biológico de *N. caninum*.

Fonte: Adaptado de Dubey (2003).

3.2.3 Sinais clínicos

A apresentação clínica da neosporose em cães é variável. Pode ocorrer de forma localizada, generalizada ou subclínica, afetando cães de diversas idades (DUBEY, 2003). Entretanto, a maioria dos sinais clínicos ocorre devido ao acometimento muscular, neurológico, e até mesmo dermatológico. As manifestações clínicas/lesões incluem miosite, paresia, dermatite, pneumonia, ataxia dos membros anteriores, tremores de cabeça, hiperextensão de membros posteriores e anteriores, dificuldade de deglutição, atrofia muscular e miocardite (DUBEY e LINDSAY, 1996), entre diversos outros.

Sinais neurológicos dependem da localização do parasito. Os membros posteriores são afetados de forma mais grave do que os membros anteriores e muitas vezes há hiperextensão rígida (DUBEY e LINDSAY, 1996), sendo que os cães mais jovens têm uma maior predisposição para desenvolverem paresia dos membros posteriores, com paralisia progressiva. Estes animais podem permanecer em alerta, porém a sobrevida é baixa. Paralisia de mandíbula, flacidez muscular e insuficiência cardíaca também são descritos (DUBEY, 2003).

De maneira geral, casos mais graves são relatados em filhotes infectados de forma congênita. Doença fatal pode ocorrer principalmente em cães idosos, com oito a 15 anos de idade (DUBEY, 2003).

3.2.4 Epidemiologia e fatores de risco

Existem vários estudos de prevalência da neosporose canina em todo o mundo, incluindo diversas regiões do Brasil, com grande variação de seus resultados. Entre os anos de 2001 e 2019, foram descritas prevalências variando de 0,7% (GONÇALES et al., 2010) a 67,56% (BENETTI et al., 2009) no nosso país (Tabela 2).

Tabela 2. Estudos de prevalência de *N. caninum* em cães de diversos estados brasileiros.

Técnica	Prevalência	N	Cidade - Estado/tipo de população	Referência
RIFI	14%	63/450	Uberlândia – MG/ zona rural, urbana e periurbana.	Fernandes et al., 2004
RIFI	8,4%	24/286	Campina Grande – Paraíba.	Azevedo et al., 2005
RIFI	13,3%	22/165	Salvador/Lauro de Freitas – Bahia / domiciliados.	Jesus et al., 2006
RIFI	11,2%	28/250	Salvador/Lauro de Freitas – Bahia / errantes.	Jesus et al., 2006
RIFI	45%	45/100	São Luis – Maranhão/ CCZ.	Teixeira et al. 2006
RIFI	29%	7/24	Guarapuava – Paraná / fazenda.	Romanelli et al., 2007
RIFI	45%	27/60	Cuiabá – Mato Grosso / Hospital Veterinário.	Benetti et al., 2008
RIFI	36,1%	26/72	Goiânia – Goiás / CCZ.	Boaventura et al., 2008
RIFI	5,5%	6/109	Rio Grande do Sul / zona urbana.	Da Cunha Filho et al., 2008
RIFI	20,4%	47/230	Rio Grande do Sul / zona rural.	Da Cunha Filho et al., 2008
RIFI	28,3%	177/625	Pernambuco / domiciliados.	Figueredo et al., 2008
RIFI	18,17%	101/556	Curitiba – Paraná / errantes ou domiciliados de zona urbana, periurbana e rural.	Fridlund-Plugge et al., 2008
RIFI	62,37%	58/93	Maranhão / zona rural.	Teixeira, 2008
RIFI	67,56%	25/37	Região sudoeste do Mato Grosso / zona rural.	Benetti et al., 2009
RIFI	11,8%	19/161	Ilhéus – Bahia.	Magalhães et al., 2009
RIFI	3,1%	7/228	Lavras – MG / clínicas veterinárias.	Guimarães, 2009
RIFI	23,3%	30/120	Pará / cães não domiciliados de zona rural.	Valadas et al., 2010.

RIFI	14%	14/100	Bauru – São Paulo.	Greca; Silva; Langoni, 2010
RIFI	0,7%	2/300	Avaré – SP / errantes.	Gonçales et al., 2010
RIFI	3,2%	16/530	Região de Teresina – Piauí.	Lopes et al., 2011
RIFI	1,98%	6/302	Botucatu – São Paulo / zona urbana.	Coiro et al., 2011
	22,32%	25/112	Londrina - Paraná /Hospital Veterinário.	Zulpo et al., 2012
RIFI	6,5%	31/476	Natal - Rio Grande do Norte / Hospital Veterinário.	Dantas et al., 2013
RIFI	7,5%	13/173	Patos – Paraíba / Hospital Veterinário.	Dantas et al., 2014
	11,3%	78/689	Botucatu – São Paulo / zona rural.	Gaio et al., 2014
RIFI	7,02%	40/570	Ibiúna – São Paulo.	Mascolli et al., 2015
RIFI	11,76%	22/187	Espírito Santo / zona rural.	Acosta et al., 2016
RIFI	7,7%	80/1.043	Paraíba.	Fernandes et al., 2018a
RIFI	37,1	29/78	Região central - Rio Grande do sul / Hospital veterinário.	Ratzlaf et al., 2018
RIFI	15,97%	42/263	Castanhal e Belém - Pará / cães domiciliados e abrigados.	Paz et al., 2019
NAT	10%	49/500	São Paulo – São Paulo / domiciliados.	Gennari et. al 2002
NAT	25%	151/611	São Paulo – São Paulo / errantes.	Gennari et. al 2002
ELISA	9,2%	33/369	Uberlândia – MG / hospital veterinário e cães errantes.	Mineo et al., 2004
RIFI, IP	6,7%	11/163	Uberlândia – MG / hospital veterinário.	Mineo et al., 2001

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; NAT: Teste de Aglutinação de Neospora; IP: Imunoprecipitação; ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática.

Alguns estudos descrevem fatores de risco associados à infecção por *N. caninum* em cães, tais como ambiente em que o animal vive (rural ou urbano) (FERNANDES et al., 2004), acesso à rua (GENNARI et al., 2002; JESUS et al., 2002; AZEVEDO et al., 2005, BENETTI et al., 2008), tipo de alimentação (BRESCIANI et al., 2007), acesso a açudes (DANTAS et al., 2014) e convívio dos hospedeiros definitivos (cães) com os hospedeiros intermediários (principalmente cães e bovinos) (SÁNCHEZ et al., 2003; DUBEY et al., 2007). A raça (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003; DA CUNHA FILHO; 2008) e a idade do animal (SOUZA et al., 2002) também já foram descritos como fatores associados a um maior índice de infecção, embora haja discordância na literatura (DUBEY, 2003; BENETTI et al., 2008; TEIXEIRA, 2008; JESUS et al., 2016).

3.2.5 Diagnóstico

Inicialmente, é necessário obter o máximo de informações sobre o histórico do animal, bem como sobre seu manejo, hábitos de alimentação, animais contactantes, ambiente em que passa mais tempo, entre outros questionamentos. Deve ser feita uma avaliação clínica minuciosa observando-se a existência de sinais sugestivos de neosporose, seguindo-se da realização de exames complementares para conclusão do diagnóstico. De maneira geral, estão disponíveis para o diagnóstico da infecção por *N. caninum* exames parasitológicos, sorológicos e moleculares (HEMPHILL et al., 2000). Cada método disponível apresenta vantagens, desvantagens e limitações, que devem ser considerados na interpretação dos resultados (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

3.2.5.1 Sorológico

A RIFI foi a primeira técnica utilizada para o diagnóstico de infecção por *N. caninum* e é considerada padrão ouro para detecção deste agente. Este método possui alta sensibilidade e identifica amostras reagentes com o anticorpo secundário marcado com fluoresceína (DEVENS, 2010; DANTAS et al., 2013).

Apesar da presença de alguns antígenos semelhantes, a reação cruzada com *T. gondii* não é tão comum. As limitações da técnica incluem a considerável subjetividade na interpretação dos seus resultados, a necessidade de prévia experiência para sua realização e a necessidade de leitura em microscópio de imunofluorescência (DEVENS, 2010).

O teste de ELISA, ao contrário da RIFI, permite a utilização de uma maior quantidade de amostras, sendo realizadas mais análises em um tempo menor, obtendo resultados mais objetivos. Por esses motivos, essa técnica é mais utilizada para o diagnóstico da infecção por *N. caninum* em grandes rebanhos ou em pesquisas (SILVA et al., 2013).

3.2.5.2 Parasitológico

Taquizoítos podem ser visualizados através do diagnóstico histopatológico e/ou citopatológico utilizando amostras teciduais e/ou diversos fluidos. Neste caso, devido à semelhança à microscopia óptica e estreita relação filogenética com o *T. gondii*, deve ser realizado diagnóstico diferencial (COSTA et al., 2018).

Exames parasitológicos de fezes também podem ser utilizados para verificação da presença de oocistos, porém esta é uma técnica pouco utilizada devido à difícil diferenciação entre os oocistos de *N. caninum* e *Hammondia heydorni*, além de depender de variáveis como a frequência e intensidade da liberação dos oocistos. Neste caso, é recomendável realizar adicionalmente a PCR para confirmar e identificar a presença de *N. caninum* nas fezes do hospedeiro definitivo (HILL et al., 2001; SLAPETA et al., 2002).

3.2.5.3 Molecular

A técnica de PCR é um importante meio de diagnóstico, com elevada especificidade e sensibilidade (HURCOVÁ et al., 2006) e, apesar de ser mais utilizada na pesquisa devido ao custo elevado, também pode ser empregada como exame de rotina para o diagnóstico das infecções por *N. caninum* (FRIDLUND-PLUGGE et al., 2008).

O método de Western Blot também pode ser utilizado e identifica as reações do antígeno-anticorpo que são direcionadas às proteínas específicas. Esta técnica é realizada em associação a outros métodos sorológicos, como a RIFI ou ELISA (ANDREOTTI et al., 2003).

3.3. *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis é uma bactéria Gram-negativa e intracelular obrigatória que pertence à ordem das Rickettsiales, família Anaplasmataceae e subdivisão α -Proteobactéria (DUMLER et al., 2001). Infecta normalmente células mononucleares do sangue (monócitos e linfócitos) de cães, gatos e também de seres humanos. Em cães, a doença causada por essa bactéria é conhecida como Eriliquiose Monocítica Canina – EMC (DUMLER et al., 2007) e é a mais importante doença transmitida por carrapatos em vários países. A enfermidade é considerada endêmica no Brasil e pode estar disseminada nas áreas urbanas, devido à biologia do seu principal vetor, o carrapato *R. sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Ehrlichia canis foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935, por Donatien e Lestoquard, sendo inicialmente denominada de *Rickettsia canis*. Após 10 anos, foi reclassificada como *E. canis*. No Brasil, seu primeiro relato ocorreu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no ano de 1973 (MOREIRA et al., 2003).

Recentes descobertas evidenciaram a presença da infecção em humanos, tornando o estudo da *E. canis* de grande importância também para a saúde pública (STICH et al., 2008). *E. chaffeensis* era conhecido como o único agente causador da erliquiose humana, até quando Perez et al., em 2006, descreveram seis casos clínicos de erliquiose humana causada por *E. canis* na Venezuela. A cepa foi denominada Ehrlichia humana venezuelana (VHE), com sequência de rDNA 16S 99% idêntica à de *E. canis*. Em 2016, foi descrita infecção humana por *E. canis* pela primeira vez na Costa Rica (BOUZA-MORA et al., 2016). No Brasil, até o momento, a erliquiose humana foi relatada apenas pela sororreatividade com *E. chaffeensis* (CALIC et al., 2004).

3.3.1 Vetor, ciclo e transmissão

A transmissão de *E. canis* ocorre através da inoculação da saliva do carrapato *R. sanguineus* infectado pela bactéria. Um único vetor desta espécie é capaz de parasitar até três hospedeiros, devido às suas mudas ocorrerem no ambiente (ALMOSNY; MASSARD, 2002). A infecção do vetor ocorre após a ingestão de leucócitos parasitados por *E. canis* durante o repasto sanguíneo em cães, especialmente aqueles que estão em fase aguda da infecção, com elevada parasitemia. No carrapato vetor, ocorre a transmissão transestadial, principalmente nas fases de ninfa e adulto, não ocorrendo a transmissão transovariana de *E. canis*. O *R. sanguineus* adulto pode sobreviver por um mínimo de 568 dias, transmitindo a infecção por mais de 155 dias depois de se desprender do hospedeiro (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012).

O carrapato transmite *E. canis* após 3 a 5 dias de sua contaminação e o período de incubação no cão varia de 7 a 21 dias. Entre o 14º e o 28º dia após a infecção o animal pode manifestar sinais clínicos da fase aguda da doença. Além da transmissão via transplacentária, outros meios de propagação da doença incluem transfusões sanguíneas e/ou utilização de agulhas ou instrumentais contaminados (ALMOSNY; MASSARD, 2002). Os cães podem permanecer infectados por até cinco anos após a infecção inicial (TRAPP et al., 2006a; ISOLA, CADIOLI; NAKAGE, 2012), favorecendo assim a manutenção do ciclo de transmissão para outros cães saudáveis contactantes.

3.3.2 Sinais clínicos

A apresentação clínica da EMC pode ocorrer de três formas: aguda, assintomática persistente (subclínica) ou crônica (HARRUS et al., 2002).

Os sinais clínicos podem variar, dependendo de cada fase. De maneira geral, a sintomatologia é ampla e também devem ser consideradas outras enfermidades no diagnóstico diferencial, como a cinomose (CHIARI, 2010). Podem ocorrer letargia, anorexia, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia e distúrbios hemorrágicos devido à trombocitopenia (HARRUS et al., 2002; CHIARI, 2010). A gravidade da doença pode estar relacionada com a cepa infectante, idade do animal e sua suscetibilidade (ISOLA, CADIOL; NAKAGE, 2012).

A fase aguda da enfermidade se inicia entre 8 e 20 dias após a infecção do cão por *E. canis*, podendo persistir durante duas a quatro semanas. Essa fase é caracterizada clinicamente por febre, anorexia, depressão, linfadenopatia e trombocitopenia, que podem desaparecer no final da quarta semana. A fase subclínica ocorre em seis a nove semanas após a infecção, porém alguns cães podem conviver com o agente nessa fase da doença por anos. Os sinais clínicos nessa etapa são mais brandos, podendo ocorrer leve perda de peso. Cães imunocompetentes podem eliminar a bactéria através da ação do sistema imune e se recuperarem sem tratamento (ISOLA, CADIOL; NAKAGE, 2012).

A fase crônica da enfermidade pode ocorrer devido à ineficiência do sistema imune sendo que, nesse caso, os sinais clínicos são mais graves podendo ocorrer ataxia, disfunção neuromotora, disfunção vestibular, hiperestesia, anisocoria, disfunção cerebelar, tremores intencionais na cabeça, paraparesia ou tetraparesia, déficit nervoso cranial, opistótono, hiperestesia e nistágmo, tosse, conjuntivite, uveíte bilateral, hemorragia retinal, vômito, depressão, além de dermatopatias, que podem ocorrer devido à imunossupressão (ALMOSNY, 2002). Podem ocorrer ainda alterações como glomerulonefrite, hemorragias, pancitopenia, hipoplasia de medula óssea resultando em anemia aplásica, além de suscetibilidade a outras infecções (MENDONÇA et al., 2005).

3.3.3 Epidemiologia e fatores de risco

Estudos realizados em várias regiões do Brasil (Tabela 3) demonstraram que a erliquiose está presente em grande parte do território brasileiro, podendo apresentar caráter endêmico (COSTA, 2011). Sua prevalência pode variar devido a fatores como condições climáticas, distribuição do vetor, população estudada, comportamento do animal e habitat, e também de acordo com a metodologia utilizada para o diagnóstico

(DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). Estudos realizados em várias partes do país descreveram prevalências que variaram entre 0% (BAHIENSE et al., 2020) a 59,66% (SOARES et al., 2017) utilizando-se técnicas de diagnóstico molecular (PCR ou nested-PCR), entre 4% (BAHIENSE et al., 2020) a 98,66% (MENESES et al., 2008) utilizando-se diagnóstico sorológico (teste rápido, ELISA ou RIFI) e entre 0% (BAHIENSE et al., 2020) e 12,4% (GUEDES et al., 2015) a partir da avaliação de esfregaços sanguíneos.

Tabela 3. Estudos de prevalência de infecção por *E. canis* em cães de diversos estados brasileiros.

Técnica	Prevalência	N	Cidade - Estado/tipo de população	Referência
PCR	33,3%	25/75	Salvador – Bahia / cães com suspeita clínica.	Meneses et al., 2008
PCR	40,0%	28/70	Botucatu – SP.	Ueno et al., 2009
PCR	38,04%	78/205	Recife – Pernambuco / Hospital Veterinário.	Ramos et al., 2010
PCR	45%	27/60	Campo Grande - Mato Grosso do Sul / CCZ.	Souza et al., 2012
PCR	0%	0/175	Toledo e Cascavel – Paraná / Hospital Veterinário.	Bahiense et al., 2020
PCR	15,1%	110/730	Londrina / Hospital Veterinário.	Paschoal et al., 2020
Nested-PCR	10,7%	12/153	Ilhéus – Bahia.	Carvalho et al., 2008
Nested-PCR	4,3%	3/69	Itabuna – Bahia.	Carvalho et al., 2008
Nested-PCR	38,9%	86/221	Ribeirão Preto.	Santos et al., 2009
Nested-PCR	20%	12/60	Cuiabá – Mato Grosso / Hospital Veterinário.	Sousa et al., 2010
Nested-PCR	25,6%	97/379	Ituberá – Bahia.	Guedes et al., 2015
Nested-PCR	59,66%	181	Campo Grande - Mato Grosso do Sul / cães com sinais clínicos sugestivos.	Soares et al., 2017
Nested-PCR	16,54%	67/405	Itabuna-Bahia /domiciliados, semidomiciliados e abrigados.	Cordeiro et al., 2019
Esfregaço sanguíneo	5,33%	4/75	Salvador – Bahia / cães com suspeita clínica.	Meneses et al., 2008
Esfregaço sanguíneo	6%	314/5.220	Jataí – GO / Hospital Veterinário.	Ferreira et al., 2012
Esfregaço	12,4%	47/379	Ituberá – Bahia.	Guedes et al., 2015

sanguíneo				
Esfregaço sanguíneo	9,09%	2/22	Lorena, São Paulo / animais com sinais clínicos sugestivos.	Prado et al., 2019
Esfregaço sanguíneo	0%	0/175	Toledo e Cascavel – Paraná / Hospital Veterinário.	Bahiense et al., 2020
RIFI	24,8%	40/161	Monte Negro – Rondônia / zona rural.	Aguiar et al., 2007a
RIFI	37,9%	58/153	Monte Negro – Rondônia / zona urbana.	Aguiar et al., 2007a
RIFI	42,5%	108/254	Cuiabá - Mato Grosso.	Silva et al., 2010.
RIFI	35,6%	168/472	Cajazeiras e Itapuã - Bahia / domiciliados.	Souza et. al., 2010b.
RIFI	72,5%	79/109	Paraíba / hospital veterinário.	Azevedo et al., 2011
RIFI	14,6%,	47/323	Municípios de Chapadinha - Maranhão/ zona urbana e rural.	Costa, 2011
RIFI	32,7%	124/379	Ituberá – Bahia.	Guedes et al., 2015
RIFI	23,7%	38/160	Lavras / Hospital Veterinário.	Fonseca et al., 2017
ELISA	23%	87/381	Londrina / Hospital Veterinário.	Trapp et al., 2006a
ELISA	98,66%	74/75	Salvador – Bahia / cães com suspeita clínica.	Meneses et al., 2008
ELISA	52,1%	184/353	Bahia.	Deiró et al., 2018
Kit ELISA Snap 3DX	29%	29/100	Itabuna- Bahia.	Carlos et al., 2007
Kit ELISA Snap 3DX	43%	43/100	Ilhéus – Bahia.	Carlos et al., 2007
Teste de Imunocromato- grafia sérica	4%	7/175	Toledo e Cascavel – Paraná / Hospital Veterinário.	Bahiense et al., 2020

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática; Snap 3DX: kit de diagnóstico (IDEXX Laboratories).

O conhecimento dos fatores de risco é necessário para que sejam adotadas medidas eficientes para o controle e prevenção das infecções. Alguns autores descrevem que não há predisposição por idade (SILVA et al., 2010; SOUSA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012), já outros afirmam que cães mais velhos podem apresentar maior prevalência da infecção (BANETH et al., 1996; DEIRÓ et al., 2018).

Geralmente a raça não é considerada um fator de risco para infecção por *E. canis* em cães (SILVA et al.; 2010; SOUSA et al., 2010). A presença do vetor no animal (TRAPP et al., 2006a; DAGNONE et al., 2003), condições climáticas, localização do vetor, comportamento animal e habitat podem estar relacionados com a maior prevalência da infecção (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). O contato com outros cães, contato com açudes e acesso à rua também foram descritos por Azevedo et al. (2011) como fatores de risco para a infecção.

3.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose é baseado na combinação dos sinais clínicos, histórico do animal, anormalidades hematológicas, achados citológicos, sorológicos e/ou moleculares.

Na fase aguda, podem ser vistas alterações no hemograma tais como trombocitopenia (MENDONÇA et al., 2005; PRADO, 2019). Leucopenia, neutropenia com desvio à esquerda, eosinopenia e monocitopenia também são descritos, além de anemia que em sua maioria se apresenta de forma arregenerativa (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009). Na prática clínica, muitas vezes o diagnóstico é sugerido com base apenas na associação entre os sinais clínicos e alterações hematológicas do paciente, principalmente trombocitopenia e anemia (ISOLA, CADIOLI; NAKAGE, 2012).

A análise parasitológica de esfregaços sanguíneos e os métodos sorológicos são frequentemente utilizados para o diagnóstico da infecção por *E. canis*, porém, devido à constante flutuação da parasitemia e reatividade sorológica cruzada entre espécies, podem ocorrer interferências na eficiência do diagnóstico. Técnicas moleculares são utilizadas a fim de que não ocorram essas intercorrências (RAMOS et al., 2010).

3.3.4.1 Parasitológico

O diagnóstico parasitológico pode ser realizado a partir da identificação de mórulas no interior de leucócitos mononucleares em esfregaços de sangue periférico. O método é simples, barato e fornece um registro permanente (FRITZ, 2009), no entanto, as mórulas geralmente são visualizadas apenas durante a fase aguda, nas duas primeiras semanas da infecção. Muitas vezes a porcentagem de células infectadas é inferior a 1%, justificando a sensibilidade baixa dessa técnica e a ocorrência de muitos resultados falsos negativos. A ausência do agente em esfregaços de sangue, portanto, não exclui a possibilidade de infecção. Além disso, a

dificuldade na identificação das mórulas também pode ocorrer devido à semelhança com grânulos citoplasmáticos, muitas vezes presentes em leucócitos não parasitados (MENESES et al., 2008; SILVA, 2013).

3.3.4.2 Sorológico

Métodos sorológicos também podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção por *E. canis* e eles têm grande importância principalmente na fase subclínica da infecção (NAKAGHI, 2008; SOUSA et al., 2012), visto que essas bactérias induzem resposta humoral específica, com soroconversão algumas semanas após a infecção (OTRANTO et al., 2009).

A RIFI tem destaque, pois é aplicável tanto em estudos experimentais quanto epidemiológicos (SILVA et al., 2010). Nesta técnica a soropositividade ocorre entre 7 e 21 dias após a infecção, com níveis máximos depois dos 80 dias (ALMOSNY; MASSARD, 2002). Após este período, os anticorpos IgG anti-*Ehrlichia* persistem por vários meses mesmo após o tratamento e eliminação da bactéria (WANER; HARRUS, 2011).

Existem disponíveis no mercado kits sorológicos para diagnóstico de infecção por *E. canis*, muitos deles baseados na técnica de “Dot-ELISA”, que podem determinar a existência de anticorpos da classe IgG específicos (NAKAGHI, 2008).

De maneira geral, os métodos sorológicos trazem algumas desvantagens tais como a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, principalmente com agentes dos gêneros *Anaplasma spp.* e *Leishmania spp.* (VALENTE, 2014), levando a resultados falso positivos. Além disso, a presença de anticorpos não indica uma infecção necessariamente ativa, tornando necessária muitas vezes a associação com outras técnicas diagnósticas. Métodos sorológicos devem, portanto, sempre ser relacionados ao histórico e exame clínico minucioso do animal (AGUIAR et al., 2007b).

3.3.4.3 Molecular

Métodos moleculares são uma ótima alternativa diagnóstica, principalmente na fase aguda da doença, quando são capazes de determinar a presença de *E. canis* mais precocemente que as técnicas sorológicas. Além disso, outra vantagem é a incomum ocorrência de reações cruzadas nesses casos (NAKAGHI, 2008).

A PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, sendo uma técnica altamente confiável para a detecção de *E. canis* (NAKAGHI, 2008). Como variação da técnica PCR convencional, a nested-PCR tem sido utilizada em muitos estudos por

também apresentar elevada sensibilidade e especificidade, com maior precisão diagnóstica. Nesta técnica, uma amplificação abrangente do segmento genômico é realizada em um primeiro momento e, utilizando-se o produto dessa primeira reação, a amplificação real da sequência alvo é realizada em seguida (RAMOS et al., 2009).

Outras vantagens da nested-PCR incluem a facilidade e capacidade de testar grande número de amostras ao mesmo tempo, o que faz dessa técnica uma excelente opção para o diagnóstico preciso da erliquiose, principalmente na fase aguda da enfermidade (LAKSHMANAN et al., 2007). Na fase assintomática ou subclínica, entretanto, amostras de sangue de cães acometidos podem ser negativas à técnica, devido à localização do agente em órgãos como o baço, ao invés da circulação sanguínea (HARRUS et al., 2004).

Nos últimos anos foi ainda descrita a utilização da técnica de LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), através da qual há amplificação do DNA alvo em condições isotérmicas (NOTOMI et al., 2000). A técnica tem grande sensibilidade e especificidade, é promissora e de fácil realização, usando como equipamento o banho seco, sem a necessidade de termociclador ou cubas para eletroforese e extração do DNA. O diagnóstico por essa técnica possibilita a identificação eficaz, com estrutura laboratorial mínima, diminuição de custos e otimização do tempo, viabilizando sua utilização na rotina veterinária apesar de ainda não ser utilizada de forma ampla (CHIARI, 2010).

3.4 *Babesia canis vogeli*

A babesiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia spp.*, que pertencem à ordem Piroplasmida e ao filo Apicomplexa (IRWIN, 2009), que são transmitidos por carrapatos de canídeos. A enfermidade possui grande importância para a espécie canina e tem distribuição cosmopolita, com maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada endêmica no Brasil (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006).

O agente etiológico da babesiose foi descrito pela primeira vez em 1888 na Romênia, por Victor Babés, após episódios de morte em bovinos (MIHALCA et al., 2010). Em 1893, o envolvimento dos carrapatos no ciclo de transmissão de *Babesia spp.* foi evidenciado por Smith e Kilborne após elevada ocorrência de febre em gados do Texas (BARREIRA et al., 2005; MIHALCA et al., 2010). No Brasil, o primeiro relato de *Babesia spp.* foi realizado por Fajardo em 1901 e ocorreu em bovinos (SOUZA et al., 2000). O primeiro relato da infecção por *B. canis* em cães ocorreu em 1895, e foi descrito por Piana e Galli-Valerio, na Itália (O'DWYER et al., 1997).

Na espécie canina, a babesiose é causada principalmente pelas espécies *B. canis* e *B. gibsoni* (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Baseado na espécie do vetor, distribuição geográfica, patogenicidade, propriedade antigênica, ausência de imunidade cruzada, sorologia e filogenia molecular, *Babesia canis* é ainda classificada em três subespécies distintas: *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli* (CARRET et al., 1999; PASSOS et al., 2005).

Em 2005, Passos et al. relataram pela primeira vez a ocorrência de *B. canis vogeli* no Brasil, sendo esta uma espécie de grande prevalência em cães do país (PASSOS et al., 2005; DUARTE et al., 2008), sendo os relatos de *B. gibsoni* mais frequentes na região Sul (TRAPP et al., 2006a; TRAPP et al., 2006b).

3.4.1 Vetor, ciclo e transmissão

O principal vetor de *B. canis vogeli* é o carrapato ixodídeo *R. sanguineus*, muito comum no Brasil. Esse mesmo vetor também apresenta importância na transmissão de *B. gibsoni* (PASSOS et al., 2005). A transmissão do parasito para os cães ocorre de forma semelhante ao descrito para *E. canis*, ou seja, através da picada e inoculação da saliva dos carrapatos ixodídeos infectados, no momento do repasto sanguíneo em todas as fases de vida, especialmente fêmeas adultas (LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; FAUSTINO, 2004).

Após a inoculação dos protozoários na forma de esporozoítos na corrente sanguínea, estes são reconhecidos e se fixam à membrana dos eritrócitos com auxílio do sistema complemento, sendo posteriormente envolvidos por endocitose e se transformando em trofozoítos (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). É possível detectar o parasito na corrente sanguínea de dois a três dias após sua inoculação, com pico da parasitemia no 3º dia e diminuição a partir do 4º dia (BICALHO et al., 2002).

As formas intraeritrocitárias de *B. canis vogeli* são grandes (> 2,5µm) e classificadas como trofozoítos e merozoítos (PASSOS et al., 2005). A multiplicação de *B. canis* dentro dos eritrócitos é realizada por fissão binária, e é nessa fase que os trofozoítos são transformados em merozoítos, os quais são geralmente vistos aos pares nas hemácias. Por sua vez, alguns merozoítos se transformam em gamontes, que são as formas infectantes para o vetor (DUARTE et al., 2008; ANTONIO, 2009; ALKMIM et al., 2019).

Nos carrapatos, além de ocorrer a reprodução sexuada de *B. canis* com a formação de esporozoítos (forma infectante para o cão) nas glândulas salivares, a manutenção e persistência do agente são asseguradas pelas transmissões transovariana e transestadial, que favorecem a permanência do agente por várias

gerações do vetor e continuação do ciclo de vida e infecção (CHAUVIN et al., 2009; ALKMIM et al., 2019).

3.4.2 Sinais clínicos

Grande parte dos animais infectados pode não apresentar sinais clínicos (VILELA, 2012) e, quando estes ocorrem, podem incluir apatia, anemia, febre, anorexia (GUIMARÃES et al., 2002; BASTOS; MOREIRA; PASSOS, 2004), mucosas pálidas (GUIMARÃES et al., 2004) ou ictéricas, hemoglobínúria (ALKMIM et al., 2019), desidratação, dor abdominal e sensibilidade renal à palpação (BASTOS; MOREIRA; PASSOS, 2004). Coinfecção com *E. canis* é comum, ocorrendo sinais clínicos semelhantes (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006).

O'Dwyer et al. (2009) afirmaram que, nos casos em que há baixa prevalência do vetor e do agente, como em algumas áreas rurais, os animais não adquirem imunidade à infecção, podendo ter maior predisposição para apresentarem sinais clínicos da enfermidade quando infectados. Devido à presença de sinais clínicos inespecíficos nos animais infectados e a possível ocorrência concomitante de infecções por outros agentes, torna-se de grande importância a realização de exames complementares de rotina e exames de diagnóstico específicos para confirmação da infecção por *B. canis* (VILELA et al., 2012).

3.4.3 Epidemiologia e fatores de risco

Não se sabe muito sobre a epidemiologia de *B. canis vogeli* no Brasil (PASSOS et al., 2005; COSTA-JÚNIOR et al., 2009) mas, de maneira geral, o país não é reconhecido como área de grande risco para babesiose canina (BOURDOISEAU, 2006; GARCIA, 2006). Bastos, Moreira e Passos (2004) afirmaram, entretanto, que a doença possui caráter endêmico em todo o país e que sua prevalência tem aumentado em algumas regiões.

Estudos foram realizados em vários estados brasileiros utilizando métodos sorológicos, moleculares e parasitológicos de diagnóstico (Tabela 4). Foi descrita prevalência entre 0,92% (COSTA, 2011) a 11,90% (VILELA, 2012) através da utilização de técnicas diagnóstico molecular; 0,5% (ARAUJO et al., 2015) a 18,18% (PRADO et al., 2019) a partir da avaliação de esfregaços sanguíneos; e entre 3,3% (COSTA-JÚNIOR et al. 2009) a 57,9% (ARAUJO et al., 2015) com a utilização de técnicas sorológicas.

Tabela 4. Estudos de prevalência de *B. canis vogeli* em cães de diversos estados brasileiros.

Técnica	Prevalência	N	Cidade - Estado/tipo de população	Referência
PCR	8%	12/150	São Paulo / área rural.	O'Dwyer et al., 2009
PCR	7,31%	15/205	Recife – Pernambuco / hospital veterinário.	Ramos et al., 2010.
PCR	0,92%	3/323	Municípios de Chapadinha- Maranhão / área urbana e rural.	Costa, 2011
PCR	2,33%	7/300	Imperatriz – Maranhão / área rural.	Silva et al., 2012
PCR	1%	3/300	Imperatriz – Maranhão / área urbana.	Silva et al., 2012
PCR	9,21%	47/510	Mato grosso – Cuiabá.	Freitas, 2017
PCR	7,69%	5/65	São Luís – maranhão.	Galeno et al., 2018
PCR	3,42%	6/175	Toledo e Cascavel – Paraná / hospital veterinário.	Bahiense et al., 2020
PCR	10,6%	49/461	Londrina / hospital veterinário.	Paschoal et al., 2020
qPCR	11,90%	37/311	Baixada fluminense, Seropédica - Rio de Janeiro / área urbana e rural.	Vilela et al., 2012
Esfregaço sanguíneo	0,5%	2/404	Petrolina – Pernambuco.	Araujo et al., 2015
Esfregaço sanguíneo	18,18%	4/22	Lorena, São Paulo / animais com sinais clínicos sugestivos.	Prado et al., 2019
RIFI	18,81%	95/505	Porterinha - Minas Gerais.	Maia et al., 2005
RIFI	36%	136/381	Londrina / hospital veterinário.	Trapp et al., 2006a
RIFI	49%	45/92	Nanuque – Minas Gerais / área rural.	Costa-Júnior et al., 2009
RIFI	34%	17/50	Belo Horizonte – Minas Gerais / área rural.	Costa-Júnior et al., 2009
RIFI	3,3%	3/102	Lavras – Minas Gerais / área rural.	Costa-Júnior et al., 2009
RIFI	57,9%	334/404	Petrolina – Pernambuco.	Araujo et al., 2015
RIFI	40,0%	64/160	Lavras – Minas Gerais / hospital veterinário.	Fonseca et al., 2017

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.

Sabe-se pouco sobre os possíveis fatores de risco associados à babesiose canina no Brasil (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO 2006), e estes podem ser controversos. Foi evidenciado, por exemplo, que cães mais jovens, principalmente com idade entre três e seis meses, podem apresentar maior predisposição à infecção (RIBEIRO et al., 1990; COSTA et al., 2011, SILVA et al., 2012). Entretanto, outros estudos descreveram que cães com mais de um ano de idade, especialmente os residentes em áreas urbanas, apresentaram maior incidência da infecção (TRAPP et al., 2006a). Costa-Junior et al. (2009) descreveram ainda que quanto mais velho o animal, maior a chance de o mesmo apresentar soropositividade para *B. canis*.

A presença de carrapatos é considerada um importante fator de risco (DANTAS-TORRE; FIGUEREDO, 2006; TRAPP et al., 2006), além do contato com áreas de floresta e acesso à rua (O'DWYER et al., 2009; SILVA et al., 2012; ARAUJO et al., 2015). A estação do ano e/ou mudanças climáticas são descritas como fatores que podem influenciar a ocorrência da infecção devido ao comportamento do vetor, visto que os carrapatos são mais abundantes durante a estação seca (GUIMARÃES et al., 2002; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; COSTA-JUNIOR et al., 2009).

3.4.4 Diagnóstico

Para um diagnóstico preciso da babesiose em cães, é necessário correlacionar adequadamente o histórico do animal com seus sinais clínicos, além de um exame físico minucioso (GUIMARÃES et al., 2002), seguindo-se a realização de exames complementares e específicos para o diagnóstico.

Achados hematológicos são importantes para avaliação do quadro geral do animal, podendo ocorrer principalmente anemia hemolítica regenerativa e trombocitopenia (BRAGA; SILVA, 2013).

É importante que o diagnóstico da babesiose canina seja realizado de forma específica a fim de verificar a espécie e/ou subespécie infectante, uma vez que a virulência, prognóstico e a resposta ao tratamento podem ser diferentes (BIRKENHEUER et al., 2003). É comum a ocorrência de co-infecções com outros agentes etiológicos que também são transmitidos pelo mesmo vetor, o que pode dificultar o diagnóstico (ALKMIM et al., 2019). Os exames específicos que podem ser empregados para o diagnóstico de *B. vogeli* estão descritos a seguir.

3.4.4.1 Parasitológico

A identificação direta dos parasitas intraeritrocitários e/ou circulantes no plasma pode ser realizada através de visualização microscópica em esfregaços sanguíneos corados (GUIMARÃES et al., 2002). Esta técnica é muito utilizada na rotina veterinária, pois sua execução é simples e tem baixo custo, porém apresenta baixa sensibilidade, além de não ser possível identificar morfologicamente diferenças específicas das espécies e subespécies. Em casos crônicos ou subclínicos, a confirmação parasitológica da infecção pode não ser possível devido à baixa parasitemia (PASSOS et al., 2005).

3.4.4.2 Molecular

As técnicas de biologia molecular apresentam grande eficácia para o diagnóstico das babesioses, principalmente em cães sintomáticos. Estes métodos permitem ainda a identificação das espécies e subespécies de *Babesia spp.* (CACCIÒ et al., 2002; MATJILA et al., 2005).

A PCR e suas variações, como a PCR em tempo real, são as técnicas mais específicas e sensíveis para o diagnóstico das babesioses (VILELA et al., 2012), sendo utilizadas com grande eficácia no diagnóstico das infecções por *B. canis vogeli* (GALENO et al., 2018). Em estudo realizado por Martin et al. (2006), a PCR convencional demonstrou especificidade e sensibilidade de 100% para *B. canis vogeli*. Como desvantagens, a PCR exige treinamento e laboratório especializado para sua realização, sendo por isso muitas vezes restrita à pesquisa (PASSOS et al., 2005).

3.4.4.3 Sorológico

Outros métodos com boa sensibilidade que também podem ser utilizados no diagnóstico das babesioses são a RIFI e o ELISA. Estes testes permitem a identificação da infecção em cães assintomáticos ou infectados na fase crônica, os quais apresentam baixa parasitemia (FURUTA et al., 2004). Como limitação, esse tipo de diagnóstico não permite verificar o estágio atual da infecção, pois o resultado indica apenas exposição prévia ao agente. Estes métodos devem ser padronizados para inclusão na rotina de diagnóstico (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Participaram da pesquisa 131 cães provenientes de áreas urbanas e rurais do município de Cândido Sales e de um distrito rural de Vitória da Conquista (Cercadinho), localizado próximo à sede de Cândido Sales. O município está localizado no sudoeste baiano, mesorregião centro-sul e pertence à microrregião de Vitória da Conquista (Figura 3).

O bioma é representado por Mata Atlântica e Caatinga, e o clima é semiárido. A população estimada do município de Cândido Sales é de 25.053 habitantes e sua área territorial é de 1.169,814 km² (IBGE 2020), fazendo limite com os municípios de Vitória da Conquista-BA, Belo Campo-BA, Encruzilhada – BA, Tremedal - BA e Ninheira – MG.

Até o momento da realização da pesquisa, a cidade de Cândido Sales-BA não possuía assistência médico-veterinária. Grande parte do município carece ainda de alguns recursos de saneamento básico adequados, tais como tratamento de esgoto e/ou água, abastecimento de água por rede geral e destinação do lixo (principalmente na zona rural) (IBGE, 2008), o que pode favorecer a transmissão de alguns patógenos hematozoários de grande importância para a saúde animal e humana.

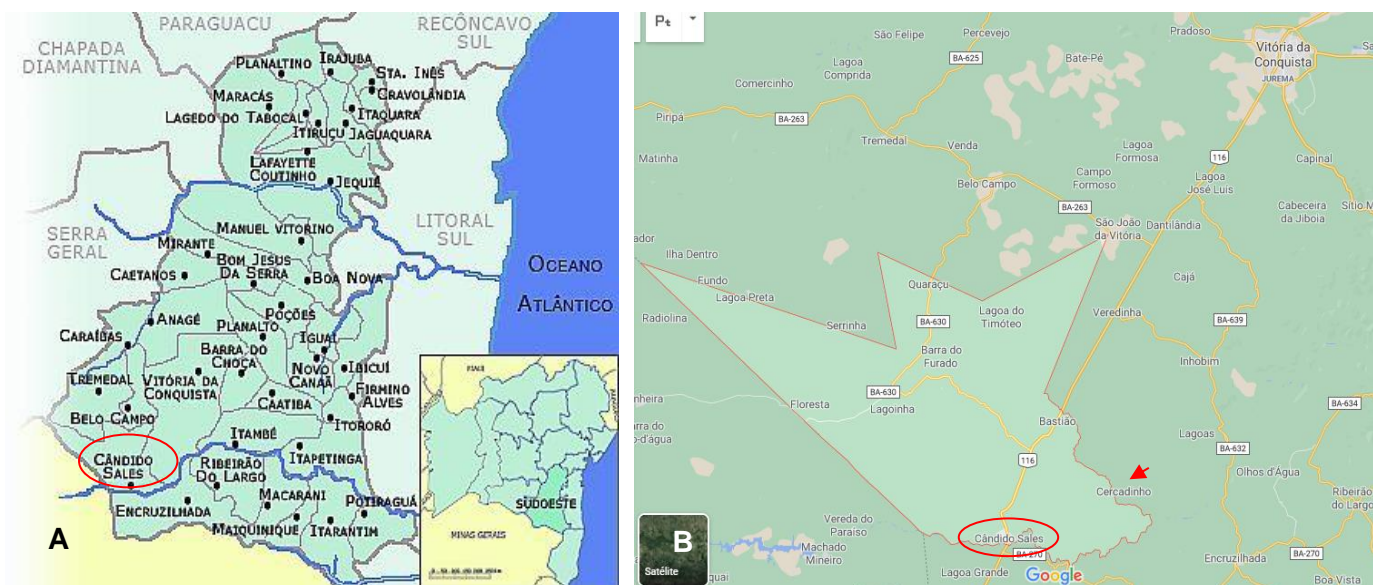


Figura 3: A – Mapa da região sudoeste da Bahia. B – Mapa de Cândido Sales-BA, evidenciando (seta) a localização e proximidade do distrito de Cercadinho (Vitória da Conquista-BA).

Fonte: A: OLIVEIRA, 2014; B: Google Maps.

4.2. Aspectos éticos

A metodologia foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (CEUA/UESC) (proctolo 005/21). A inclusão dos animais no estudo e a obtenção de amostras biológicas ocorreram somente após autorização por parte dos tutores e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1).

4.3. Animais e obtenção de amostras biológicas

Foram incluídos no estudo 131 cães domésticos domiciliados e semi-domiciliados e a amostragem foi realizada por conveniência.

Após contenção física dos animais, foi realizada coleta de aproximadamente 5ml de sangue venoso por punção de veia cefálica para realização de exames moleculares e sorológicos. O sangue coletado de cada animal foi dispensado em dois tubos, um com anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA), e o outro tubo com ativador de coágulo. O sangue acondicionado nos tubos com anticoagulante foi destinado à extração de DNA para posterior diagnóstico molecular e também à confecção de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hematozoários no sangue total. Os tubos com ativador de coágulo foram submetidos à centrifugação para obtenção do soro, que foram armazenados em microtubos de 2ml a -20°C para posterior realização de diagnóstico sorológico.

Uma gota de sangue de cada animal foi coletada por meio de punção simples com agulha em ponta de orelha para confecção de esfregaço e subsequente pesquisa de hemoparasitas no sangue periférico. Adicionalmente, foi realizado o preenchimento de um questionário a fim de investigar aspectos relacionados ao histórico e manejo do animal para verificar os fatores de risco associados às infecções, além de eventuais queixas clínicas no momento da coleta (APÊNDICE 2).

4.4. Pesquisa de hemoparasitas

Os esfregaços sanguíneos confeccionados a partir das amostras de sangue total e periférico foram corados com panótico rápido. Após secagem, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular com auxílio da objetiva de 100x, a fim de realizar pesquisa e identificação de hematozoários ou outras inclusões.

4.5. Diagnóstico sorológico de infecção por *N. caninum* e *T. gondii*

As amostras de soro obtidas foram submetidas à RIFI a fim de verificar a presença de anticorpos IgG anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*. Foram consideradas positivas as amostras com titulação igual ou superior a 1:50 para *N. caninum* (CONRAD et al., 1993) e 1:16 para *T. gondii* (BARROS et al., 2013). O diagnóstico sorológico foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UESC (HV-UESC).

Para o diagnóstico de *N. caninum* foram utilizadas lâminas com 10 poços sensibilizadas com taquizoítos da cepa NC-Bahia (GONDIM et al., 2001) cultivados em células Vero. Para o diagnóstico sorológico da infecção por *T. gondii*, as lâminas foram sensibilizadas com taquizoítos da cepa RH (FIGUEREDO, 2008; VALADAS et al., 2010), também cultivados em células Vero. Para a visualização da reação, foi utilizado o conjugado Anti-Dog IgG -F7884, (SigmaAldrich®) marcado com isotiocianato de fluoresceína. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (OLYMPUS, BX51®). Foram consideradas positivas as reações em que a fluorescência periférica total foi observada em mais de 50% dos taquizoítos. Os controles positivo e negativo foram obtidos de amostras em estudos anteriores na região.

4.6. Diagnóstico molecular de infecção por *Ehrlichia canis* e *Babesia canis vogeli*

4.6.1. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada utilizando o método Fenol Clorofórmio Álcool Isoamílico (ANEXO 1), no Laboratório de Virologia do HV-UESC. Posteriormente, a concentração final de DNA em cada amostra foi determinada por espectrofotometria no Nanodrop (densidade óptica de 260nm) no Laboratório de Genética do HV-UESC. As amostras foram armazenadas a -20°C para realização de etapas subsequentes do diagnóstico molecular.

4.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O diagnóstico molecular da infecção por *E. canis* foi realizado através da técnica de nested-PCR, adaptada de Murphy et al. (1998). Para a primeira reação, foram utilizados os seguintes *primers* iniciadores: ECC (5'-

AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'), que amplificam um fragmento do gene 16S do gênero *Ehrlichia*. Para a segunda reação foram utilizados os *primers* iniciadores ECAN (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') e HE3 (5'TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'), com a obtenção de um produto final com 396 pares de base.

As reações foram desenvolvidas num volume final de 25 µL composto por: 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM TrisHCl, pH 9,0, 0,2 µM de cada iniciador, 2U GoTaq® Flexi DNA Polymerase (PROMEGA®) e 5µL de DNA purificado de cada amostra. As reações de Nested-PCR utilizaram 3 µL dos produtos amplificados obtidos a partir da primeira reação. O protocolo de amplificação da primeira reação consistiu em desnaturação inicial por 3 minutos a 94° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 68° C por 2 minutos, extensão a 72° C por 2 minutos, e uma extensão final de 72° C por 7 minutos (CARVALHO et al., 2008). Para a segunda reação, a desnaturação inicial realizada ocorreu por 3 minutos a 94° C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 58° C por 2 minutos, extensão a 72° C por 1,5 minutos, com extensão final a 72° C por 7 minutos (CARVALHO et al., 2008). Como controle positivo foram utilizadas amostras positivas para *E. canis*. Água ultrapura foi utilizada para o controle negativo

O diagnóstico molecular de *B. canis vogeli* foi realizado através da técnica de PCR convencional, na qual foram utilizados os *primers* iniciadores CAN 626R (5'-GAA CTC GAA AAA GCC AAA CGA-3 ') e CAN 172F (5'-GTT TAT TAG TTT GAA ACC CGC-3'), a fim de amplificar um fragmento do gene do RNA ribossomal 18S (450 pb) (INOKUMA et al., 2004).

As reações foram realizadas num volume final de 25 uL, contendo 5 uL de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM TrisHCl, pH 9,0, 0,2 µM de cada iniciador e 2U GoTaq® Flexi DNA Polymerase (PROMEGA®). As condições de amplificação serão as seguintes: um ciclo inicial a 94° C por 5 min, seguido por 36 ciclos a 94° C por 1 min, anelamento a 55° C por 1 min, 72° C por 1 min e uma etapa de extensão final a 72° C durante 7 min. (RIBEIRO et al., 2017). Como controle positivo foram utilizadas amostras positivas para *B. canis vogeli*. Água ultrapura foi utilizada para o controle negativo.

Os produtos amplificados nas reações de Nested-PCR para *E. canis* e nas reações de cPCR para *B. canis vogeli* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®). Foi utilizado tampão TAE para a corrida e a eletroforese foi realizada a 75V/200mA durante 40 minutos.

Para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). As bandas foram verificadas em um transiluminador ultravioleta, seguido de avaliação pelo Locus Biotechnology L-Pix Transilluminator.

4.7. Análise estatística

A análise estatística dos fatores de risco associados às infecções foi realizada mediante análise bivariada e multivariada, utilizando software Epi Info 3.5.2. Para a análise bivariada foi utilizado o teste de qui-quadrado, associando cada variável independente com as dependentes (animais positivos ou negativos). As variáveis que apresentaram valor de p igual ou inferior a 0,3 foram selecionadas para realização da análise multivariada utilizando regressão logística não-condicional. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico parasitológico

A partir da avaliação dos esfregaços sanguíneos foi possível visualizar mórulas de *Ehrlichia spp.* em neutrófilos do sangue total de dois animais. Piroplasma em hemácia foi encontrado no esfregaço sanguíneo de ponta de orelha de um cão. Adicionalmente, *Hepatozoon spp.* foi visualizado em esfregaço sanguíneo de ponta de orelha de dois animais (Figura 4). Foi possível ainda verificar a presença de inclusões de Lentz em amostras do sangue total de três animais e em amostra de sangue periférico de um animal, sugerindo infecção pelo vírus da cinomose canina.

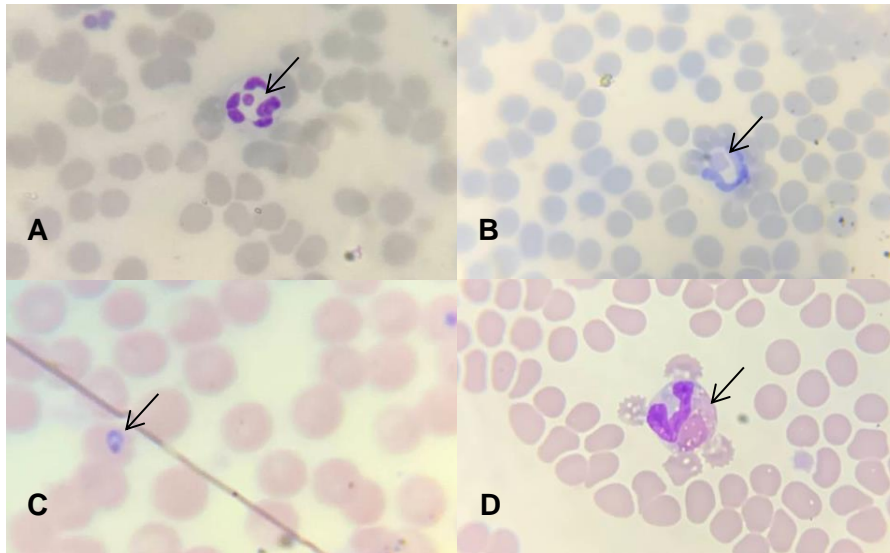


Figura 4: Fotomicrografia de esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido em aumento de 100X evidenciando (setas). A- Mórula de *Ehrlichia spp.*; B- *Hepatozoon spp.*; C- Piroplasma; D- Corpúsculo de Lentz.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

5.2 Diagnóstico sorológico e molecular

No diagnóstico sorológico (Figura 5), obteve-se prevalência de 70,2% (92/131) e 67,9% (89/131) para *N. caninum* e *T. gondii* através da técnica de RIFI, respectivamente.

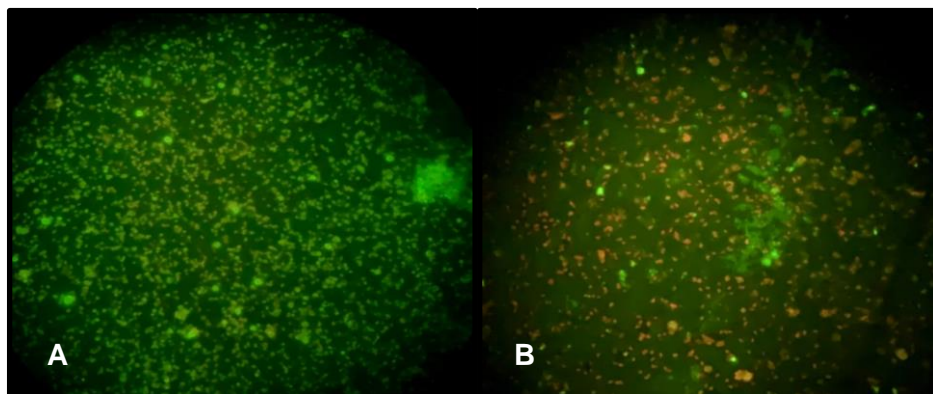


Figura 5: Leitura da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em microscópio de epifluorescência a partir de lâminas marcadas com isotiocianato de fluoresceína. A: Amostra positiva para *Neospora caninum*; B: amostra negativa para *Neospora caninum*.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

A Nested-PCR (figura 6) detectou positividade de 37,4% (49/131) dos cães estudados para *E. canis*. Nenhum cão teve resultado positivo para *B. canis vogeli* na técnica molecular. Apenas um dos dois cães que apresentaram mórulas de *Ehrlichia spp.* na avaliação dos esfregaços sanguíneos foi positivo para *E. canis* no diagnóstico molecular.

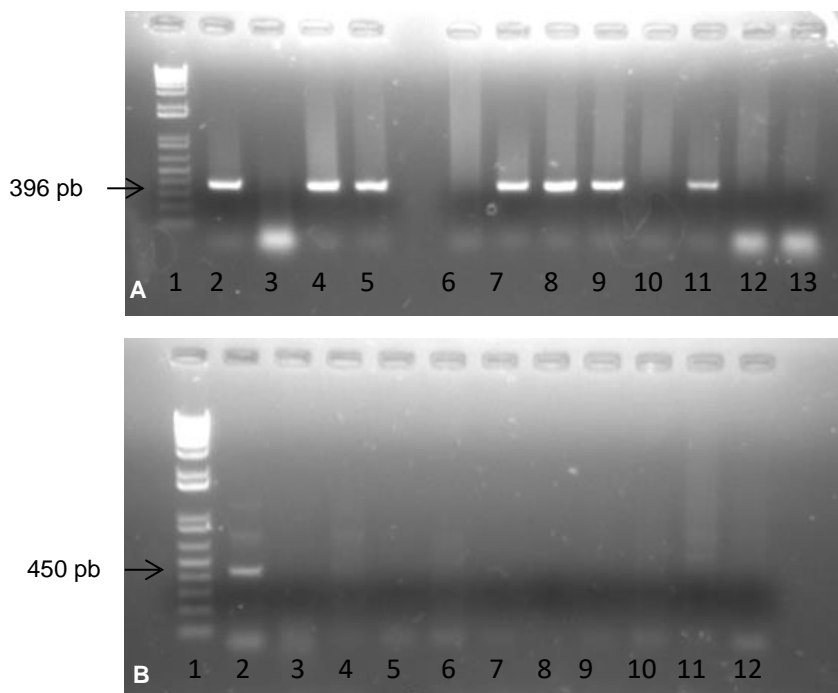


Figura 6: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2,0%, com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®). A: amplicómeros da nested PCR para *E. canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN/HE3. Canaleta 1: marcador de peso molecular em escala 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), canaleta 2: controle positivo (396 pb), canaleta 3: controle negativo, canaletas 4, 5, 7, 8, 9 e 11: amostras positivas, canaletas 6, 10, 12, 13: amostras negativas. B: amplicómeros da PCR para *B. vogeli* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CAN 626R/CAN 172F. Canaleta 1: marcador peso molecular em escala 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), canaleta 2: controle positivo (450 pb), canaleta 3: controle negativo, canaletas 4 a 12: amostras negativas.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

5.3 Coinfecções

Considerando os resultados obtidos pelas técnicas de diagnóstico sorológico e molecular, verificou-se que 94,65% (124/131) dos cães estavam infectados por pelo menos um dos agentes etiológicos estudados. Coinfecções por três dos agentes pesquisados (*E. canis*, *T. gondii* e *N. caninum*) estavam presentes em 17,55%

(23/131) dos animais. Monoinfecções ocorreram em 31,29% (41/131) dos cães, sendo 19,84% (26/131) por *T. gondii*, 9,92% (13/131) por *N. caninum* e 1,52% (2/131) por *E. canis*. Em 45,03% (59/131) dos cães foi constatada coinfeção por *N. caninum* e *T. gondii*; em 32,82% (43/131) houve coinfeção por *N. caninum* e *E. canis*, e em 20,61% (27/131) ocorreu coinfeção por *T. gondii* e *E. canis* (Figura 7).

A presença de infecção por *E. canis* no presente estudo se mostrou significativa para o favorecimento da infecção por *T. gondii* ($p=0,025$; *odds ratio* 0,3959; CI 95% 0,18-0,84), assim como para *N. caninum* ($p=0,0014$; *odds ratio* 4,8265; CI 95% 1,84-

12,62). Apesar de mais frequente, coinfeções por *N. caninum* e *T. gondii*, entretanto, não apresentaram associação estatística significativa ($p= 0,218$; *odds ratio* 0,5364; 95% CI 0,22 -1,26).

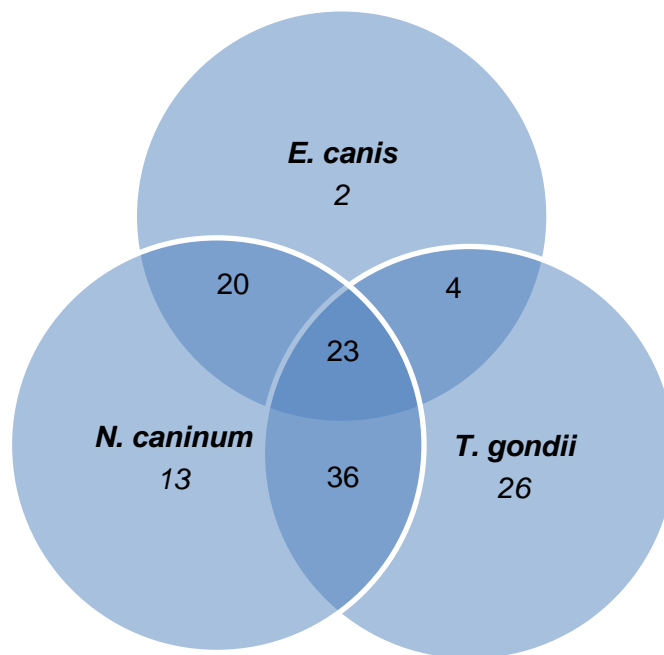


Figura 7. Coinfecções por *E. canis*, *N. caninum* e *T. gondii* em cães da região de Cândido Sales-BA, considerando-se os resultados obtidos no diagnóstico sorológico e molecular.

Dentre os dois cães positivos para o gênero *Ehrlichia spp.* no diagnóstico parasitológico, ambos foram soropositivos para *N. caninum* e um foi soropositivo para *T. gondii*. Um dos cães que apresentou *Hepatozoon spp.* no esfregaço sanguíneo foi positivo para os três agentes (*E. canis*, *N. caninum* e *T. gondii*), enquanto o outro apresentou soropositividade apenas para *N. caninum*. O cão que apresentou *Piroplasma* em hemácias foi positivo para *E. canis* e *N. caninum*. Dos quatro animais

que apresentaram inclusões de Lentz, três estavam coinfectados por *E. canis*, três foram soropositivos para *N. caninum* e dois soropositivos para *T. gondii*.

5.4 Queixas clínicas

As queixas clínicas foram relatadas pelos proprietários de 27,48% (36/131) dos cães e estão dispostas na tabela 5. Para alguns animais foi relatada mais de uma queixa clínica.

Tabela 5. Queixas clínicas relatadas pelos proprietários dos cães incluídos no estudo.

Queixa clínica	Animais
Lesão dermatológica*	14,50% (19/131)
Inapetência/anorexia	6,10% (8/131)
Vômitos	3,81% (5/131)
Diarreia	3,05% (4/131)
Alteração ocular (irritação/secreção)	3,05% (4/131)
Fraqueza muscular	2,29% (3/131)
Incoordenação motora	0,76% (1/131)
Convulsão	0,76% (1/131)
Tosse	0,76% (1/131)
Secreção nasal	0,76% (1/131)

*Alopecia/descamação/dermatite/presença de nódulos.

5.4.1 Queixas clínicas associadas ao diagnóstico

As queixas clínicas descritas pelos proprietários foram relacionadas ao diagnóstico definitivo de cada agente, considerando os resultados obtidos a partir das técnicas de diagnóstico sorológico e molecular. Em 26,53% (13/49) dos cães positivos para *E. canis* foram descritas queixas clínicas, e todos esses animais possuíam coinfeções com pelo menos um protozoário (*N. caninum* e/ou *T. gondii*) (Tabela 6).

Tabela 6. Queixas clínicas nos cães positivos para *E. canis* pela técnica molecular.

Queixa clínica	Animais positivos para <i>E. canis</i>
Lesão dermatológica	14,28% (7/49)
Apatia	4,08% (2/49)
Anorexia/inapetencia	2,04% (1/49)
Diarreia	2,04% (1/49)
Irritação ocular	2,04% (1/49)
Fraqueza muscular	2,04% (1/49)

As queixas clínicas relatadas para os animais soropositivos para *N. caninum* e *T. gondii* estão dispostas na tabela 7. Em 25,84% (23/89) dos cães positivos para *T. gondii*, foram descritas queixas clínicas, sendo que em 65,21% (15/23) destes cães ocorreu coinfeção com pelo menos outro agente (*E. canis* e/ou *N. caninum*). Nos cães positivos para *N. caninum* foram descritas queixas em 26,08% (24/92), dentre os quais 83,33% (20/24) apresentavam coinfeções com pelo menos um agente (*E. canis* e/ou *T. gondii*). Para alguns animais foi relatada mais de uma queixa clínica.

Tabela 7. Queixas clínicas descritas em animais positivos para *N. caninum* e *T. gondii*.

Queixa clínica	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
Lesão dermatológica	14,13% (13/92)	14,60 (13/89)
Vômitos	5,43% (5/92)	3,37% (3/89)
Anorexia/inapetência	6,52% (6/92)	4,49% (4/89)
Apatia	6,52% (6/92)	5,61% (5/89)
Diarreia	2,17% (2/92)	2,24% (2/89)
Alteração respiratória (Tosse/secreção nasal)	2,17% (2/92)	2,24% (2/89)
Alteração oftalmológica (Irritação/secreção ocular)	3,26% (3/92)	3,37% (3/89)
Fraqueza muscular/ Incoordenação motora	2,17% (2/92)	1,12% (1/89)
Epilepsia/convulsão	1,08% (1/92)	1,12% (1/89)

5.5. Fatores de risco

A avaliação estatística dos fatores de risco associados à infecção por *E. canis* em cães mostrou que apenas a idade (acima de 3 anos) foi significativa (Tabela 8a e 8b).

Tabela 8a. Fatores associados à infecção pela *E. canis* em cães positivos.

Variável		N	Cães positivos	Prevalência%	OR	95%CI	P-valor
Sexo	Macho	67	27	40,30%			
	Fêmea	64	22	34,38%	1,2886	0,63 -2,62	0,6032210227
Idade	<3 anos	43	9	20,93%	0,3176	0,1 3-0,74	0,0113507327
	>3 anos	88	40	45,45%			
Raça	SRD	107	42	39,25%			
	Com raça definida	24	7	29,17%	1,5692	0,59 -4,10	0,4905287771
Habitat	Zona urbana	72	26	36,11%	0,8847	0,43– 1,80	0,8756183165
	Zona rural	59	23	38,98%			
Ambiente	Apenas interno	39	10	25,64%	0,4686	0,20 -1,07	0,1064787356
	Com acesso a ambientes externos	92	39	42,39%			
Acesso à rua	Com acesso	91	34	37,36%	0,9942	0,46 -2,14	1,0000000000
	Sem acesso	40	15	37,50%			
Carrapatos	Sim	76	33	43,42%	1,8706	0,89– 3,91	0,1362326291
	Não	55	16	29,09%			
Controle de ectoparasitas	Sim	29	8	27,59%	0,5668	0,22– 1,40	0,3073090445
	Não	102	41	40,20%			
Animais contactantes	Sim	109	42	38,53%	1,3433	0,50 – 3,5	0,5527448634
	Não	22	7	31,82%			
Cães contactantes	Sim	98	38	38,78%	1,2667	0,55 -2,90	0,7256999924
	Não	33	11	33,33%			

Tabela 8b. Associação entre cães positivos para *E. canis* e a variável idade.

Variáveis	Odds ratio	Intervalo de confiança 95%	P valos (<0.05)
Idade	0,3176	0,1363 – 0,7403	0,0079

P= 0,3944

Likelihood: 0,0052

Quanto à avaliação dos fatores de risco relacionados à infecção por *N. caninum*, houve diferença estatística significativa relacionada à idade (maior que 3 anos) e ao habitat do animal, sendo que os animais provenientes da zona rural apresentaram maior risco de infecção em relação aos animais da zona urbana. Apesar de na análise bivariada (qui-quadrado) a variável ambiente se mostrar significativa, essa informação não foi confirmada pela análise multivariada (regressão logística) (tabelas 9a e 9b).

Tabela 9a. Fatores associados à infecção pela *N. caninum* em cães positivos.

Variável	N	Cães	Prevalência	OR	95%CI	P-valor	
Sexo	Macho	67	46	68,66%	0,8571	0,40– 1,81	0,8324554528
	Fêmea	64	46	71,88%			
Idade	<3 anos	43	21	55,81%	0,3715	0,17– 0,81	0,0204057711
	>3 anos	88	68	77,27%			
Raça	SRD	107	77	71,96%	1,5400	0,60– 3,89	0,5033144929
	Com raça definida	24	15	62,50%			
Habitat	Zona urbana	72	44	61,11%	0,3601	0,16– 0,80	0,0198472528
	Zona rural	59	48	81,36%			
Ambiente	Apenas interno	39	22	56,41%	0,4067	0,18– 0,89	0,0410366160
	Com acesso a ambientes externos	92	70	76,09%			
Acesso à rua	Com acesso	91	68	74,73%	1,9710	0,89– 4,34	0,1361952816
	Sem acesso	40	24	60,00%			
Animais contactantes	Sim	109	77	70,64%	1,1229	0,41– 3,01	1,0000000000
	Não	22	15	68,18%			
Cães contactantes	Sim	98	71	72,45%	1,5026	0,65– 3,46	0,4608060352
	Não	33	21	63,64%			

Bovinos contactantes	Sim	22	18	81,82%	2,0676	0,65–6,57	0,3207241959
	Não	108	74	68,52%			
Hábito de caça/ ingestão de carne crua	Sim	38	31	81,58%	2,3232	0,92–5,85	0,1083827233
	Não	93	61	65,59%			

Tabela 9b. Associação entre cães positivos para *N. caninum* e as variáveis idade e habitat.

Variáveis	Odds ratio	Intervalo de confiança 95%	P valos (<0.05)
Idade	0,2922	0,12-0,67	0,0042
Habitat	0,2861	0,12-0,68	0,0046

P= 0,0000

Likelihood: 0,0005

Quanto à avaliação estatística dos fatores relacionados à infecção por *T. gondii*, nenhuma variável foi considerada significativa (tabela 10).

Tabela 10. Fatores associados à infecção pela *T. gondii* em cães positivos.

Variável	N	Cães positivos	Prevalência a%	OR	95%CI	P-valor	
Sexo	Macho	67	47	70,15%	1,2310	0,59–2,56	0,7133505849
	Fêmea	64	42	65,63%			
Idade	<3 anos	43	31	72,09%	1,3362	0,60-2,97	0,6080975703
	>3 anos	88	58	65,91%			
Raça	SRD	107	75	70,09%	1,6741	0,67–4,16	0,3822955696
	Com raça definida	24	14	58,33%			
Habitat	Zona urbana	72	49	68,06%	1,0120	0,48–2,11	1,0000000000
	Zona rural	59	40	67,80%			
Ambiente	Apenas interno	39	30	76,92%	1,8644	0,79–4,39	0,2187719764
	Com acesso a ambientes externos	92	59	64,13%			
Acesso à rua	Com acesso	91	62	68,13%	1,0294	0,46–2,27	1,0000000000
	Sem acesso	40	27	67,50%			
Animais contactantes	Sim	109	76	69,72%	1,5944	0,62–4,09	0,4687974907
	Não	22	13	59,09%			

Gatos contactantes	Sim	38	24	63,16%	0,7385	0,33–1,63	0,5869817177
	Não	93	65	69,89%			
Hábito de caça/ ingestão de carne crua	Sim	38	24	63,16%	0,7385	0,33–1,63	0,5869817177
	Não	93	65	69,89%			

6. DISCUSSÃO

6.1. Diagnóstico parasitológico

A baixa prevalência de *Ehrlichia spp.* no diagnóstico parasitológico, ao contrário do que foi encontrado no diagnóstico molecular, pode ter ocorrido devido à baixa parasitemia apresentada pelos animais, possivelmente em decorrência da fase da infecção. Outro fator que pode ter contribuído para esse resultado é a baixa sensibilidade da técnica de diagnóstico parasitológico (ORIÁ, 2001). A técnica de Nested-PCR em contrapartida é altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis*, e se mostrou muito eficaz no diagnóstico (LAKSHMANAN et al., 2007).

Por outro lado, em alguns animais podem ser observadas mórulas sugestivas de *Ehrlichia spp.* em leucócitos não mononucleares e o animal se apresentar negativo para *E. canis* pela técnica molecular, como ocorreu em um animal desse estudo. Neste caso, os achados podem ser interpretados como outra espécie de *Ehrlichia sp.* ou podem também ser caracterizadas como outros tipos de inclusões intracitoplasmáticas como grânulos azurófilos, plaquetas e material proveniente de fagocitose, o que pode levar a resultados falso-positivos na citologia (MYLONAKIS et al., 2003).

6.2. Diagnóstico molecular

A prevalência de infecção por *E. canis* encontrada neste estudo é semelhante à descrita por Ramos et al. (2010) em Recife, Pernambuco, que descreveram positividade em 38,04% (78/205) dos cães avaliados utilizando a técnica de PCR convencional, e por Santos et al. (2009) em Ribeirão Preto, São Paulo, que constataram prevalência de 38,9% (86/221) utilizando a Nested PCR. Por outro lado, esse estudo demonstrou maior prevalência de infecção em relação a outros que também foram realizados no estado da Bahia utilizando técnicas de diagnóstico molecular. Meneses et al. (2008) descreveram prevalência de 33,3% em Salvador. Cordeiro et al. (2019) encontraram 16,54% de animais positivos para *E. canis* em Itabuna enquanto Guedes et al. (2013) encontram prevalência de 25,6% em Ituberá.

Por outro lado, Carvalho et al. (2008) descreveram prevalência de 10,7% e 4,3% em Ihéus e Itabuna, respectivamente.

A maior ocorrência da infecção por esse agente na região de Cândido Sales pode estar relacionada a ausência de acompanhamento médico veterinário, com conseqüente falta de informação sobre o manejo dos animais bem como sobre os cuidados profiláticos adequados relacionados ao controle de ectoparasitas.

Em relação à pesquisa de infecção por *B. canis vogeli*, nenhum cão teve resultado positivo nesse estudo. Esse resultado corrobora com os obtidos em outras pesquisas realizadas anteriormente no Brasil, apesar de grande parte delas relatarem uma prevalência relativamente baixa de infecção (abaixo de 10%), também utilizando a técnica de diagnóstico molecular (PCR convencional) (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; O'DWYER et al., 2009; RAMOS et al., 2010; SILVA et al., 2012; FREITAS, 2017; GALENO et al., 2018; BAHIENSE et al., 2020). Por outro lado, a observação de Piroplasma no esfregaço sanguíneo de um animal negativo para *B. canis vogeli* no diagnóstico molecular alerta para a ocorrência de outras espécies ou subespécies de *Babesia spp* na região estudada. É importante lembrar, no entanto, que o diagnóstico parasitológico não permite a diferenciação morfológica entre as espécies/subespécies deste parasita (PASSOS et al., 2005).

Sugere-se que mais amostras de sangue de cães provenientes da região de Cândido Sales sejam avaliadas utilizando-se técnica de diagnóstico molecular com primers que possam amplificar fragmentos de outros genes alvo de *B. canis vogeli*. Podem ainda ser associadas técnicas sorológicas a fim de concluir se este patógeno é realmente ausente ou sua ocorrência é rara nesta localidade.

6.3. Diagnóstico sorológico

A prevalência de infecção por *N. caninum* verificada nos animais deste estudo é superior à relatada em outros trabalhos realizados nos últimos 20 anos no Brasil, incluindo o resultado obtido por Benetti et al. (2009), que descreveram prevalência de infecção de 67,56% (25/37) em cães da zona rural da região sudoeste do Mato Grosso utilizando técnica sorológica. Esse resultado é de grande importância para a região de Cândido Sales, sobretudo para as propriedades rurais, pois alerta sobre a possibilidade de infecção em bovinos, o que pode ocasionar episódios de aborto nesta espécie e prejuízos econômicos (DUBEY, 2003).

Por sua vez, a prevalência de infecção por *T. gondii* encontrada no presente estudo teve valor semelhante ao obtido por Valadas et al. (2010) no Pará, Amazonas, e por Barbosa et al. (2003) em Salvador, Bahia, que obtiveram valores de prevalência

de 69,8% (90/120) e 63,55% (143/225), respectivamente, através da utilização da RIFI. A elevada frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* encontrada em cães da região alerta para a possibilidade de risco para os seres humanos, uma vez que os cães podem compartilhar das mesmas fontes de infecção do homem (GALVÃO et al., 2014).

A elevada taxa de ocorrência de infecções por esses protozoários em cães da região estudada também pode estar relacionada à ausência de atendimento médico veterinário e consequente carência de conhecimento por parte dos tutores sobre a profilaxia dessas infecções. Aspectos relacionados ao manejo sanitário e hábitos de vida dos animais, bem como contato com outras espécies como bovinos e felinos, hábitos alimentares, falta de higiene ambiental, saneamento básico e tratamento de água, também podem favorecer a transmissão e persistência dos agentes no ambiente.

6.4. Coinfecções

A ocorrência de coinfecção por *T. gondii* e *E. canis* observada nos cães deste estudo obteve resultado semelhante ao encontrado por Deiró et al. (2018). Esses pesquisadores utilizaram as técnicas sorológicas de RIFI e Elisa para diagnóstico de infecção por *T. gondii* e *E. canis* em 353 cães da Bahia, respectivamente, e encontraram coinfecção por esses agentes em 20,1% (71/353) dos animais avaliados.

A presença de infecção por *E. canis* no presente estudo se mostrou significativa para o favorecimento da infecção por *T. gondii*. Este dado pode ser justificado de acordo com o que foi sugerido por Girardi et al. (2014), que realizaram estudo sorológico em cães com sinais neurológicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso e afirmaram que a infecção com *E. canis* pode ser considerada um fator que causa imunossupressão, contribuindo para uma maior susceptibilidade de ocorrência da toxoplasmose e desencadeamento da reativação de cistos, sendo essa coinfecção amplamente descrita na literatura.

O mesmo pode ser explicado para os casos de coinfecção por *E. canis* e *N. caninum* diagnosticados nesse estudo, em que foi constatado que a presença da infecção por *E. canis* pode ser um fator que favorece a coinfecção por *N. caninum*, visto que esse protozoário também é descrito como um agente oportunista (AGUIAR et al., 2012).

Coinfecções com outros hemoparasitas são esperadas em indivíduos infectados por *E. canis*. Como foi descrito anteriormente, um mesmo vetor, especialmente o carrapato da espécie *R. sanguineus*, pode transmitir inúmeros

agentes diferentes, favorecendo a presença de coinfeções com outros hematozoários, como *Hepatozoon spp.* (NELSON; COUTO, 1998; SCHOULS et al., 1999). Os hábitos de vida dos animais e o manejo sanitário, como acesso à rua, contato com outros animais, tipo de alimentação, higienização do ambiente, entre outros, também podem estar relacionados à ocorrência de infecções por protozoários, especialmente *N. caninum* e *T. gondii*.

A taxa de coinfeção por *N. caninum* e *T. gondii* observada nesse estudo foi muito superior quando comparada às obtidas por Mineo et al. (2001), que descreveram apenas 3,1% (5/163) de amostras reativas para ambos os parasitas em cães com sinais neuromusculares provenientes de Uberlândia, Minas Gerais, e por Acosta et al. (2016), que descreveram apenas um animal com coinfeção por *N. caninum* e *T. gondii* no Espírito Santo. A infecção por *N. caninum*, entretanto, não apresentou associação estatística significativa com a ocorrência simultânea de *T. gondii*, assim como também foi descrito previamente por Bresciani et al. (2007) em estudo sorológico realizado no município de Araçatuba, São Paulo. Apesar de não haver correlação significativa, a alta ocorrência dessa coinfeção pode contribuir para a manifestação clínica das doenças (GIRARDI et al., 2014). Devido à elevada taxa de infecção concomitante por *N. caninum* e *T. gondii* observada nesse estudo, sugere-se que ambos os agentes etiológicos devam ser considerados nos diagnósticos clínicos diferenciais especialmente em cães com distúrbios neuromusculares, respiratórios e/ou gastrointestinais (MINEO et al., 2001).

A cinomose, por sua vez, é frequentemente descrita em coinfeções com *E. canis*, *T. gondii* e *N. caninum* devido à sua característica imunossupressora (MORETTI et al., 2002; AGUIAR et al., 2012).

De maneira geral, coinfeções são muito comuns em cães do Brasil pois estes animais se encontram expostos a diversos agentes patogênicos. Isso pode ocorrer especialmente devido ao clima tropical, que favorece a proliferação de vetores e a manutenção de oocistos no ambiente (DEIRÓ et al., 2018).

6.5. Queixas clínicas associadas ao diagnóstico

Apesar da alta prevalência de infecções e coinfeções pelos agentes estudados, a maioria dos animais avaliados não apresentou queixa clínica, sugerindo que a maioria dessas infecções ocorreu de modo assintomático/subclínico. Outro aspecto a ser considerado é que algumas manifestações clínicas podem não ter sido observadas pelos tutores. É importante destacar que as amostras submetidas para avaliação neste estudo foram obtidas de animais escolhidos por conveniência.

Poucos cães positivos para *E. canis* apresentaram queixas clínicas sugestivas da infecção e isso pode ter ocorrido devido o modo de apresentação da doença e/ou fase da infecção, visto que é comum a apresentação subclínica desta doença, como mencionado anteriormente. Adicionalmente, a baixa frequência de manifestação clínica dessa infecção também pode ser justificada por uma boa resposta imunológica em cães imunocompetentes. Nestes animais pode haver uma rápida recuperação da infecção e eliminação do agente mesmo sem a realização de tratamento (HARRUS et al., 2002; MENDONÇA et al., 2005; ISOLA, CADIOL; NAKAGE, 2012).

Da mesma forma, a maioria dos animais soropositivos para *T. gondii* e/ou *N. caninum* não apresentaram queixas clínicas sugestivas das enfermidades específicas. Vale ressaltar, entretanto, que um resultado positivo à sorologia para *N. caninum* ou *T. gondii* não significa necessariamente que o animal terá manifestações clínicas relacionadas à doença. Cães soropositivos com elevados títulos de IgG, por exemplo, podem não apresentar a infecção de forma aguda no momento da coleta. Muitos desses animais podem demonstrar apenas títulos de contato sem apresentarem necessariamente infecção aguda ou a doença causada por esses agentes (REICHEI, 1998; PLUGGER et al., 2011), ou esta pode ainda ocorrer de forma assintomática (DANTAS et al. 2013). Destaca-se que a ocorrência de coinfeções pode contribuir para a manifestação clínica de algumas dessas protozooses, devido ao caráter oportunista desses agentes em relação ao estabelecimento da doença (GIRARDI et al., 2014).

Todos os casos de animais positivos que apresentaram queixas clínicas devem ser analisados de forma cautelosa e individual, pois estas manifestações podem ter etiologia variada e não envolver apenas os agentes etiológicos pesquisados nesse trabalho. Como exemplo, pode-se destacar as lesões dermatológicas que foram comumente relatadas nos animais com infecções por *N. caninum*, *T. gondii* e *E. canis*. Estas alterações, no entanto, podem ser decorrentes de outras inúmeras causas, como a presença de ácaros, infecções bacterianas ou fúngicas, alergias, neoplasias, doenças autoimunes, entre outros.

De todo modo, tanto o diagnóstico de infecções com apresentação clínica quanto diagnóstico de infecções subclínicas são importantes epidemiologicamente (BOAVENTURA et al., 2008). Além disso, o reconhecimento prévio das infecções é recomendado para que seja estabelecido tratamento adequado e/ou acompanhamento clínico de cada animal, a fim de se evitar complicações futuras (STRITAL et al., 2016).

6.6. Fatores de risco

Neste estudo, a idade foi considerada como fator de risco para infecção por *E. canis*, corroborando com os resultados obtidos por Baneth et al. (1996) e Deiró et al. (2018), que descreveram que cães adultos podem apresentar uma maior prevalência de infecção devido ao maior tempo de exposição aos patógenos. Por outro lado, Silva et al. (2010), Sousa et al. (2010) e Ferreira et al. (2012) não consideraram a idade como um fator de risco para infecção por *E. canis*.

Quanto à avaliação dos fatores de risco associados à infecção por *N. caninum*, a idade do animal (acima de 3 anos) foi considerada como fator de risco para a infecção, assim como descrito por Souza et al. (2002) e Cañón-Franco et al. (2003). Esse achado também pode ser decorrente do maior tempo de exposição do animal ao *N. caninum*. O habitat rural também foi considerado como fator de risco para essa infecção, e esse resultado corrobora com os obtidos por Patitucci et al. (2001) em um estudo realizado no Chile, e por Da Cunha Filho et al. (2008), em pesquisa realizada em Pelotas, Rio Grande do Sul. O maior risco de infecção nos cães provenientes de ambientes rurais pode ser justificado pelo acesso mais fácil dos animais às fontes de infecção, com maior possibilidade de ingestão de carcaças, fetos bovinos abortados e restos placentários (SOUZA et al., 2002; DA CUNHA FILHO et al., 2008). Em contrapartida, Valadas et al. (2010) não encontraram associação entre a infecção por *N. caninum* e o habitat dos animais.

Neste estudo, nenhuma variável foi identificada como fator de risco para a infecção por *T. gondii*, entretanto, de acordo com a literatura, maior risco de infecção pode estar relacionado à idade do animal (BARBOSA et al., 2003 ; AZEVEDO et al., 2005, CARLOS 2010; OLIVEIRA et al. 2019, DEIRÓ et al. 2018, LOPES et al. 2011, FERREIRA et al. 2016, AZEVEDO 2005, DANTAS et al. 2014 e CANÓN-FRANCO et al., 2004), contato com gatos (AZEVEDO et al. 2005), acesso à rua (CANÓN-FRANCO et al. 2004; DANTAS et al. 2013) e tipo de alimentação (CAMOSSI et al., 2008; MOURA et al., 2009; FÁBREGA et al., 2020). Sugere-se que sejam realizados estudos com maior número de amostras a fim de identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção por *T. gondii* nos cães na região de Cândido Sales-BA.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo confirmam a presença de altos índices de infecção por *N. caninum*, *T. gondii* e *E. canis* na região de Cândido Sales, Bahia. A idade

(acima 3 anos) foi considerada fator de risco para as infecções por *E. canis* ($p=0,0079$) e *N. caninum* ($p=0,0042$). Além disso, o habitat (rural) também foi considerado como fator de risco para infecção por *N. caninum* ($p=0,0046$).

Em 94,65% (124/131) dos cães, houve diagnóstico de infecção por pelo menos um dos agentes etiológicos encontrados. As coinfeções mais frequentes foram causadas por *N. caninum* e *T. gondii*, que ocorreram em 45,03% (59/131) dos cães. A presença de infecção por *E. canis* se mostrou significativa para o favorecimento da infecção por *T. gondii* ($p=0,025$) e *N. caninum* ($p=0,0014$).

Apesar da alta prevalência de infecções, queixas clínicas foram descritas em apenas 27,48% (36/131) dos animais. Estes achados confirmam a necessidade da utilização de técnicas de diagnóstico específico na rotina veterinária, pois é comum a ocorrência de infecções subclínicas, com manifestações inespecíficas ou que apresentem coinfeções com outros agentes imunossupressores ou oportunistas. Os fatores de risco descritos devem ser observados, e medidas profiláticas devem ser tomadas a fim de evitar a persistência e transmissão desses agentes na região.

Sugere-se que sejam realizados estudos com um maior número de animais para que sejam elucidados os fatores de risco especialmente para infecções por *T. gondii*, e para confirmar a ausência ou a rara ocorrência de *B. vogeli* em cães da região de Cândido Sales-BA.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. C. L.; CENTODUCATTE, L. D.; SOARES, H. S.; MARCILI, A.; GONDIM, M. F. N.; JUNIOR, J. R. L.; GENNARI, S. M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from rural properties surrounding a biological reserve, Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p.536-539, 2016. ISSN 1984-2961. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612016075>.
- AGUIAR, D. M. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Baltimore, v.44, n.1, p.126-132, 2007a.
- AGUIAR, D. M.; AMUDE, A. M.; SANTOS, L. G. F.; RIBEIRO, M. G.; UENO, T. E. H.; MEGID, J.; PAES, A. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; GENNARI, S. M. Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 221-224, 2012.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 796-802, 2007b.
- ALKMIM, M. **Deteção de hemopatógenos e seus vetores na população de cães no município de Itabirito – MG**. 2019. 83p. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.
- ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. **Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose**. In: ALMOSNY, N.R.P. *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. Rio de Janeiro: LF Livros, p. 13-56, 2002.
- ÁLVARES-GARCÍA, G. **Identificación y caracterización de antígenos de *Neospora caninum* com interés inmunodiagnóstico em bovinos**. 2003. 301f. Tese (Doutorado) – Departamento de sanidade Animal. Facultad de Veterinária, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A.C.; ZAPPA, V. *Babesia canis*: Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII. n.12, 2009.
- ARAUJO, A.; SILVEIRA, J. A. G.; AZEVEDO, S. S.; NIERI-BASTOS, F. A. RIBEIRO, M. F. B; LABRUNA, M. B. HORTA, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, 2015.
- AZEVEDO, S. S.; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F.; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. F.; UCHÔA, I. C. P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. Brasil. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.
- AZEVEDO, S. S.; BATISTA, C. S. A.; VASCONCELOS, S. A.; AGUIAR, D. M.; RAGOZO, A. M. A.; RODRIGUES, A. A. R.; ALVES, C. J.; GENNARI, S. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 51-56, 2005.
- BABIENSE, C.R.; MATOS, A. C.; ABATE, H. L.; SANTOS, N. S. R.; VIDOTTO, O. Ocorrência de *Babesia vogeli*, *Mycoplasma spp.*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma spp.* em uma população hospitalar de cães do Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 41, n. 6, p. 3133-3144, 2020.
- BARBOSA, M. V. F.; GUIMARÃES, J. E.; ALMEIDA, M. A. O.; GONDIM, L. F. P.; REGIS, G. B. Freqüência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de

Salvador-Bahia, Brasil. **Braslian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p. 457-465, 2003.

BARREIRA, J. D.; ROSSI, M. I. D.; PIRES, F. A.; SILVA, G. V. O.; MASSARD, C. L. Dinâmica da infecção de *Babesia bovis* (Babés, 1888, Starcovici, 1893) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1131-1135, 2005.

BARROS A. D. S.; DA FONSECA A. R. F.; DE SOUZA. O. L. N., MOTA, R. A.; ALVES, C. J.; DE AZEVEDO, S. S. Ocorrência e fatores de risco associados às infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v, 43, n. 11, 2013.

BASTOS, C. V.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annais New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 158-160, 2004.

BENETTI, A. H.; TONIOLLO, G. H.; SANTOS, T. R., GENNARI, S. M.; COSTA, A. J.; DIAS, R. A. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 177-180, 2008.

BENETTI, A. H.; SCHEIN, F. B.; SANTOS, T. R.; TONIOLLO, G. H., COSTA, A. J.; MINEO, J. R.; LOBATO J.; SILVA, D. A. O ; GENNARI, S. M. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 29-33, 2009.

BICALHO, K. A.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M.F. B. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 5, 2002.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4172-4177, 2003.

BOAVENTURA, C. M.; OLIVEIRA, V. S. F.; MELO, D. P. G.; BORGES, L. M. F.; SILVA, A. C. Prevalência de *Neospora caninum* em cães de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 15-22, 2008.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p. 566-571, 2009.

BOURDOISEAU, G. Canine babesiosis in France. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 118-125, 2006.

BOUZA-MORA, L.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J.; SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016. DOI:10.1016/j.ttbdis.2016.09.012

BRAGA, J. F. V.; SILVA, S. M. M. S. Babesiose canina: uma visão geral da doença. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.12, n. 2, p. 204-213, 2013.

BRANDÃO, L.P., HAGIWARA, M.K. Babesiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 41, p. 50-59, 2002.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; NUNES, C. M.; SERRANO, A. C. M.; MOURA, A. B.; STOBBE, N. S.; PERRI, S. H. V.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos

contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba – SP. **ARS Veterinaria** v. 23, n.1, p. 40-46, 2007.

BRESCIANI, K.D.S.; DA COSTA, A. J.; NAVARRO, I. T.; TONIOLLO, G. H.; SAKAMOTO, C. A. M.; ARANTES, T. P.; GENNARI, S. M. Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 189-201, 2008.

BROWNLEE, L.; SELTON, R. K. Diagnosis of naturally occurring toxoplasmosis by bronchoalveolar lavage in a cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 3, p. 251, 2001.

CACCIÒ, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. R.; SLEMANDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.285–292, 2002.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A.M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M. B. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.3, 2004. DOI:10.1590/s1413-86702004000300011.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ROCCA, A.; BELEM, Z.R. Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação, estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimático de captura de IgM, A practical test for serology of toxoplasmosis: the hemagglutination test, comparative study with immunofluorescence tests and IgM uptake immunoenzymatic assay. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 22, n. 6, p. 196-201, 1986.

CAMOSSI, L.G.; FACCIOLI, P.Y.; MENOZZI, B.D.; DAHER, S.R.; LANGONI, H.I. Environmental risk factors for canine toxoplasmosis in a deprived district of Botucatu, SP, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. On-line version ISSN 1678-9199. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14 n. 3 p. 450-465, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992008000300006>.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; SOUZA, S. L. P.; SILVA, J. C. R.; PINTER, A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.71-74, 2003

CANÓN-FRANCO, W. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; SILVA, J. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 2, p. 113-118, 2004.

CARLOS, R. S. A. **Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e fatores determinantes da infecção canina em Ilhéus-Itabuna, BA**. 2010. 56f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

CARLOS, R. S. A.; NETAI, E. S. M.; SPAGNOLII, F. H.; OLIVEIRAI, L. L. S.; BRITOI, R. L. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. P. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16 n. 3, p. 117-120, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612007000300001>.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B., GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 298-303, 1999.

- CARSTEN, G.K L.; WOLFGANG, B.; DOMINIQUE, S. Toxoplasmosis: a persisting challenge. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 460–463, 2001. DOI:10.1016/s1471-4922(01)02093-1.
- CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p.657-662, 2008. DOI: 10.4238/vol7-3gmr468.
- CAVALCANTE, G. **Infecção por *Neospora caninum* em cães (*Canis familiaris*), jovens, adultos e em cadelas gestantes**. 2010. 105f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia, São Paulo.
- CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, 2009.
- CHIARI, M. F. **New method of diagnostics for *Ehrlichia canis*: PCR x Lamp**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- COIRO, C. J.; LANGONI, G.; SILVA, R. C.; ULLMANN, L. S. Fatores de risco para leptospirose, leishmaniose, neosporose e toxoplasmose em cães domiciliados e peridomiciliados em Botucatu-SP. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 3, p. 393-407, 2011.
- CONRAD, P.A.; BARR, C.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J.P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of *Neospora spp.* from aborted bovine fetuses. **Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 239-249, 1993.
- CORDEIRO, J. M. A; GUEDES, P. E. B.; MUNHOZ, A. D.; SILVA, F. L. Molecular diagnosis and risk factors of canine ehrlichiosis in the municipality of Itabuna-Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 897-906, 2020.
- COSTA, A. P. **Aspectos epidemiológicos de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia sp.* em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do leste Maranhense, microrregião de Chapadinha-MA, Brasil**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís.
- COSTA, T. L. C.; IGLESIAS, G. A.; ROSA, J. M. A.; BENTO, H. J.; RONDELLI, L. A. S.; FURLAN, F.; MORGADO, T. O.; DUTRA, V.; CORRÊA, S. H. R. Detecção molecular de *Neospora caninum* em macaco-da-noite (*Aotus azarae*) de vida livre no estado do Mato Grosso: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1227-1232, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9900>.
- COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B., REMBECK, K.; RABELO, E. M. L., ZÄHLER-RINDER, M., HIRZMANN, J.; PFISTER, K., PASSOS, L. M. F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 0–260, 2009. DOI:10.1016/j.rvsc.2008.07.002.
- COVRE, K. C. **Frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na Região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil**. 2014. 68f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.
- CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

CUNHA, N.C.; CORDEIRO, M.D.; BRAVO, S.A.C.; MATOS, P.C.M.; ALMOSNY, N.R.P.; DA FONSECA, A.H. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em cães no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 109-112, 2016.

DA CUNHA FILHO, N. A.; LUCAS, A. S.; PAPPEN, F. G.; RAGOZO, A. M. A.; GENNARI, S.M.; JUNIOR, T. L.; FARIAS, N. A. R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 301- 306, 2008.

DAGNONE, A. S.; DE MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 2, p. 191-209, 2001.

DANTAS, S. B. A.; FERNANDES, A. R. F.; NETO, O. L. S.; MOTA, R. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S. Ocorrência e fatores de risco associados às infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 2042–2048, 2013. DOI: 10.1590/s0103-84782013001100020.

DANTAS, S. B. A.; FERNANDES, A. R. F.; NETO, O. L. S.; MOTA, R. A.; ALVES, C. J. A.; AZEVEDO, S. S. Fatores de risco para a ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães domiciliados no Nordeste do Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 875-881, 2014.

DANTAS-TORRES, F. Causative agents of canine babesiosis in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, p. 210-211, 2008.

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

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

DEIRÓ, A. G. J.; MONTARGIL, S. M. A.; CARVALHO, F. S.; MUNHOZ, A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Antibody occurrence of Anti-*Toxoplasma gondii*, *Leishmania* sp. and *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia State. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, 2018.

DEVENS, B. A. Neosporose canina: biologia, etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. **PUBVET**, v. 4, n. 40, ed. 145, art. 975, 2010.

DUARTE, S. C; LOULY, C. C. B.; NETO, O. J. S.; ROMANOWSKI, T. N. A.; JUNIOR, R. S. L., LINHARES, G. F. C. Diagnóstico Parasitológico e Molecular da Babesiose Canina na Cidade de Goiânia – GO. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, p. 229-236, 2008.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C B.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E O.; KWOK, O. C H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, 60–64, 2007.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57–72, 2004.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, p.1-313, 2010.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n.1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. **Toxoplasmosis and Neosporosis**. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Ed., p. 754-766, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323–367, 2007. DOI:10.1128/cmr.00031-06.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C, BARTA, J.R., BJERKÅS, I., BJÖRKMAN, C., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., BUXTON, D., ELLIS, J.T., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A., HILL, D.E., HOWE DK, JENKINS, M.C, KOBAYASHI, Y., KOUDELA, B., MARSH, A.E., MATTSSON, J.G., MCALLISTER, M.M., MODRÝ, D., OMATA, Y., SIBLEY, L.D., SPEER, C.A., TREES, A.J., UGGLA, A., UPTON, S.J., WILLIAMS, D.J., LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

DUMLER J.S.; MADIGAN J. E.; PUSTERIA, N. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 45–51, 2007.

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

FÁBREGA, L.; RESTREPO, C. M.; TORRES, A.; SMITH, D.; CHAN, P.; PÉREZ, D.; CUMBRERA, A.; CABALLERO, E. Z. Frequency of *Toxoplasma gondii* and risk factors associated with the infection in stray dogs and cats of Panama. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 927, 2020. DOI:10.3390/microorganisms8060927.

FERNANDES, A.R.F.; COSTA D.F.; ANDRADE M.R.; BEZERRA C.S.; MOTA R.A.; ALVES C.J.; LANGONI H.; AZEVEDO S.S. Soropositividade e fatores de risco para leptospirose, toxoplasmose e neosporose na população canina do Estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 957-966, 2018a.

FERNANDES, A. R. F.; COSTA, D. F. C.; PIMENTA, C. L. R. M.; ARAÚJO, K. N.; SILVA, R. B. S. S.; MELO, M. A.; LANGONI, H.; MOTA, R. A.; AZEVEDO, S. S. Occurrence and risk factors of zoonoses in dogs and owners in Sertão, Paraíba State, Northeastern Brazil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 1057-1066, 2018b. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n3p1057.

FERNANDES, B. C. T. M.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L. P.; CARVALHO, J. M.; OLIVEIRA, W. G.; CURY, M. C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais - Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 33-40, 2004.

FERREIRA, F. P.; MIURA, A. C.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Frequência de anticorpos anti-*toxoplasma gondii* em cães com sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose. **Ciência Animal Brasileira**, v.17 n.4, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i440999>

FERREIRA, M. R. A.; FREITAS-FILHO, E. G.; DIAS, M.; MOREIRA, C. N. Prevalência, fatores de risco e associações laboratoriais para erliquiose monocítica canina. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 1345, 2012.

FIGUEREDO, L. A.; DANTAS-TORRES, F.; FARIA, E. B.; GONDIM, L. F. P.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; MOTA, R. A. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 9–13, 2008. DOI:10.1016/j.vetpar.2008.07.009.

FONSECA, J. P.; BRUHN, F. R. P.; RIBEIRO, M. J. M.; HIRSCH, C.; ROCHA, C. M. B.M.; GUEDES, E.; GUIMARÃES, A. M. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. **Ciência Animal Brasileira**, v.18, n. 0, 2017. DOI:10.1590/1089-6891v18e-36095.

FREITAS, A. L. S. **Detecção molecular de *Babesia vogeli* em cães do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso**. TCC (Especialização em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Mato grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, Cuiabá, f. 11, 2017.

FRESCHI, C.R., HIGA, A.C., TINUCCI, C.M., PANCRACIO, H.P., MACHADO, R.Z. Caracterização de antígenos de *Toxoplasma gondii* pela técnica de "Western Blotting em soros de cães com sinais clínicos suspeitos de toxoplasmose. **ARS Veterinaria**, v. 21, n. 2, p. 265-271, 2005.

FRIDLUND-PLUGGE, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; RICHARTZ, R. R.T.B.; DAL PIZZOL, J.; MACHADO JR, P.C.; PATRÍCIO, L.F.L.; ROSINELLI, A.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná state, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p.222-226, 2008.

FRITZ, C. L. Emerging tick-borne diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 2, p. 265-278, 2009.

FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v, 39, n. 4, p. 1566-70, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.4.1566-1570.2001.

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

GAIO, F. C.; SALINA. A.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em cães da zona rural do município de Botucatu – São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 2, p. 288-296, 2014.

GALENO, L. S.; MORENO, B. F. S.; ALVES, A. M.; FONSECA, W. C.; DURÃES, C. C.; ABREU, D. M.; SILVA, I. M. R.; FERREIRA, P. T. R.; CHAVES, D. P. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães da cidade de São Luís – MA, Brasil. **Pubvet**, v. 12, n. 6, p. 131, 2018.

GALVÃO, A. L. B., VASCONCELLOS, A. L., NAVARRO, I.T., BRESCIANI, K. D. S. Aspectos da toxoplasmose na clínica de pequenos animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 393-410, 2014.

GARCIA, A. T. Piropasma infection in dogs in northern Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 97–102, 2006.

GEMMILL, T.J. Self assessment: what is your diagnosis? **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 110-112, 2008.

GENNARI, S. M., YAI, L. E. O., D'ÁURIA, S. N. R., CARDOSO, S. M. S., KWOK, O. C. H., JENKINS, M. C., DUBEY, J. P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.177-179, 2002.

GIRARDI, A. F.; LIMA, S. R.; MELO, A. L. T; BOA SORTE, E. C.; ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Ocorrência de anticorpos anti-

Toxoplasma gondii e *Ehrlichia canis* em cães com alterações nervosas atendidos em hospital veterinário universitário. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1913-1921, 2014.

GOMES, M. C. O. Estado atual da toxoplasmose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 2, p. 122–128, 1970. DOI:10.1590/S0037-86821970000200008.

GONÇALEZ, C. C.; PAES, A. C.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C.; GRECA, H.; CAMOSSO, L.G.; GUIMARÃES, F. F.; ULLMANN, L. S. Anticorpos para *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães errantes albergados em canil privado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p.1011-1014, 2010.

GONDIM, L. F. P.; MCALLISTER, M.M; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O. M.; JESUS, E. E. V.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDEZ, H. S.; ALMEIDA, M. A. O.; FREIRE S. M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p.1-7, 2001.

GOOGLE, INC. **Google Maps.** Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/C%C3%A2ndido+Sales+++BA/@-15.3222873,-41.9557809,9z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x748cb7304a3c9c3:0x97c44fcb6cac55!8m2!3d-15.5053815!4d-41.2352703>> Acesso em: 20 de janeiro de 2021.

GUEDES, P. E. B.; OLIVEIRA, T. N. A.; CARVALHO, F. S.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; WENCESLAU, A. A.; SILVA, F. L. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, 115-121, 2015.

GRECA, H.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. e anti-*Neospora caninum* em cães de Bauru, SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 224-227, 2010.

GUIMARÃES, A. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; SANTA ROSA, I. C. A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Revista Clínica Veterinária**, v. 41, n. 41, p. 60-68, 2002.

GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para Babesia, Toxoplasma, Neospora e Leishmania em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 49-53, 2009.

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

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 361–368, 2002. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00022-6.

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

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; CONRATHS, F.J.; de MEERSCHMAN, F.; ELLIS, J.T.; INNES, E.A.; McALLISTER, M.M; ORTEGA-MOURA, L.M.; TENTER, A.J.; TREES, A.J.;

UGGLA, A.; WILLIAMS, D.J.L.; WOUDA, W. A European perspective on *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 877-924, 2000.

HILL, D.E., LIDDEL, S., JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 395-398, 2001.

HURCOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 150-154, 2006.

IBGE. **Censo Demográfico**, 2019. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 26 de janeiro de 2020.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, 2008. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 26 de janeiro de 2020.

INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M. Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 41-346, 2004.

IRWIN, P. J. Canine Babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasite & Vectors**, v.2, p. S4, Supplement 1, 2009.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P.; Erliquiose canina – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX, n.18, 2012. ISSN: 1679-7353.

KING, J. S.; SLAPETA, J.; JENKINS, D. J.; ALQASSAB, S. E.; ELLIS, J. T.; WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n.4, p. 229-35, 2005.

LABRUNA, M.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 11, p. 24-32, 2001.

LAKSHMANAN, B.; JOHN, L.; GOMATHINAYAGAM, S.; DHINAKARRAJ, G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* from blood of naturally infected dogs in India. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, n. 4, p. 307-312, 2007.

LEAL, P.D.S; COELHO, C.D. Toxoplasmose em cães: uma breve revisão. **Coccidia**, v.2, p. 2-39, 2014.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de Neospora caninum em bovinos leiteiros e em eqüinos no estado do Paraná, Brasil**. 2002. 184p.Tese (Doutorado) - Processos Biotecnológicos, Agroindústria, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Considerações sobre a importância do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) dentro da sociedade humana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.3, p.177-185, 2012.

LOPES, M. G.; MENDONÇA, I. L.; FORTES, K. P.; AMAKU, M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011. DOI:10.1590/s1984-29612011000200004

MAGALHÃES, V. C. S.; SICUPIRA, P. M. L.; GONDIM, L. F. P.; MUNHOZ, A. D. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães do município de Ilhéus, Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 306-311, 2009.

MAIA, M. G. **Aspectos epidemiológicos da babesiose canina em área semi-árida do Estado de Minas Gerais**. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

MARTIN, A. R.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K.; BROWN, G. K. *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in Australia. **Experimental Parasitology**, v. 112, p. 63–65, 2006.

MASCOLLI, R.; SOTO, F. R. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; PINHEIRO, S. R.; GUILLOUX, A. G. A.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, P. V.; GENNARI, S. M.; FERNANDES, A. R. F.; PENNA, H. F. J.; VASCONCELLOS, S. A. Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis and neosporosis in the dog population of Ibiúna, São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 3777-3786, 2015

MATJILA, P. T.; NIJHOF, A. M.; TAOUFIK, A.; HOUWERS, D.; TESKE, E.; PENZHORN, B.L.; DE LANGE, T.; JONGEJAN, F. Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.23–29, 2005.

MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MCGUIRE, A. M. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.

MELO, A. L. T.; SILVA, G. C. P.; AGUIAR, D. M. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da cidade de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1507-1514, 2012.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose Canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**. v.21, n.1, p.167-174, 2005.

MENESES, Í. D. S.; SOUZA, B. M. P. S.; TEIXEIRA, C. M. M.; GUIMARÃES, J. E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

MIHALCA, A. D.; COZMA, V.; ŞUTEU, E.; MARINCULIC, A.; BOIREAU, P. The quest for piroplasms: from Babes and Smith to molecules. **Scientia Parasitologica**, v. 11, n. 1, p. 14-19, 2010.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A. C. B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J. MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98, n. 4 p.239-245, 2001.

MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; NÄSLUNDI, K.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.414-417, 2004.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-76, 2004.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, 2003.

MORETTI, L. A.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. G.; AGUIAR, D. M.; PAES, A. C.; PEZERICO, S. B.; SILVA, A. V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.

MOURA, A. B.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E. B.; PISETTA, G. M.; JUNIOR, A. H. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18 n. 3, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4322/rbpv.01803009>.

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

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v.91, n.2-3, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-700, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Doenças protozoárias polissistêmicas**. Medicina interna de pequenos animais. 2ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.1035-1036, 1998.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n.12, e63, 2000.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; PINTO, E.D.S. Desenvolvimento de *Babesia canis* (Piana e Gallivalerio, 1985) nos ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 58-61, 1997.

O'DWYER, L. H.; LOPES, V. V. A.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 23-26, 2009.

OLIVEIRA, G. M. S., SIMÕES, J. M.; SCHAEER, R. E.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, R. J. M.; PINHEIRO, A. M. C. M.; CARVALHO, S. M. S.; MARIANO, A. P. M.; CARVALHO, R. C.; MUNHOZ, A. D. Frequency and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women and their pets in Ilhéus, Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, e20190250, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0250-2019>.

OLIVEIRA, J. J. A. **A ação civil pública como instrumento de tutela ambiental a ser manejado pelas associações de defesa do meio ambiente: um estudo de caso na região sudoeste da Bahia**. 2014. 137f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA.

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

PASCHOAL, A. T. P.; SILVA, A. C. S.; BERNARDES, J. C.; CALDART, E. T.; PINTO-FERREIRA, F.; SOARES, J. F.; MATOS, A. C.; MORAES, N. R.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O.; MITSUKA-BREGANÓ, R. Molecular detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in a hospital population of dogs clinically diagnosed with hemoparasitosis. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 41, n. 5, s. 1, p. 2143-2152, 2020.

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

PATITUCCI, A. N., PHIL, M., PÉREZ, M. J., ROZAS, M. A., ISRAEL, K. F. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.33, p.227-232, 2001.

PAZ, G. S.; COLHADO, B. S.; ANTON, M. M.; ROCHA, K. S.; SILVA, D. B.; MORAES, C. C. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* em cães do estado do Pará. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, e33566, 2019.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 110-117, 2006.

PLUGGER, N.F.; FERREIRA, F.M.; RICHARTZ, R.R.T.B.; SIQUEIRA, A.; DITTRICH, R.L. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, p.202-206, 2011.

PRADO, L. G. **Avaliação clínica e laboratorial de equídeos sororreagentes para *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Minas Gerais, Brasil**. 2014. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PRADO, L. G.; SENE, R. V.; MEDEIROS, E. C.; NASCIMENTO, L. M.; FARIA, A. B. F. Hemoparasitas e bactérias hemotrópicas observadas por microscopia direta em amostras de sangue periférico de cães em uma clínica particular no município de Lorena, São Paulo, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 17, n. 3, p. 16-20, 2019.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES JR, D. S.; SOUZA, INGRID I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 58-62, 2009.

RAMOS, R. A. N.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; OLIVEIRA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (North-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, p. 1115–1120, 2010.

RATZLAFF, F.R.; ENGELMANN, A. M.; LUZ, F. S.; BRÄUNIG, P.; ANDRADE, C. M.; FIGHERA, R. A.; BOTTON, S. A.; VOGEL, F. S. F.; PÖTTER, L.; SANGIONI, L. A. Coinfecções por *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães necropsiados da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 109-116, 2018. DOI:10.1590/1678-4162-9412.

REICHEL, M.P. Prevalence of Neospora antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 38, 1998.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A.C.; AZZOLINI, T.; BONES, E.R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37 n. 2, p. 129–136, 2017. DOI:10.1590/S0100-736X2017000200006.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; PASSOS, L. M. F.; GUIMARÃES, A. M. Frequência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 511–517, 1990.

RODRIGUES, J. Y.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA-SORTE E. C.; GASPARETTO, N. D.; SEABRA DA CRUZ, F. A. C. S.; SOUSA V. R. F. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs of riverside communities of Mato Grosso Pantanal, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**

Veterinária, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 531-535, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016067>.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO O, M. E. R.; OGAWA, L.; DE PAULA, V.S.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 202-7, 2007. DOI: 10.1016/j.rvsc.2006.04.001.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. S. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 155-158, 2002.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; SOBREIRA, F. L. L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 145–148, 2009.

SCHOOLS, L. M.; VAN DE POL, I.; RIJPKEMA, S. G. T.; SCHOT, C. S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* species in Dutch Ixodes ricinus ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2215-2222, 1999.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74-80, 2001.

SILVA, A. B.; COSTA, A. P.; DE SÁ, J. C.; COSTA, F.B.; SANTOS, A. C. G.; RITA DE MARIA S. N. C. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na mesorregião do oeste maranhense, nordeste brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, p. 388- 95, 2012.

SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; LIMA, V. Y.; MORETTI, L.; PINHEIRO, J.P.; TANAKA, E. M.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 23- 27, 2005.

SILVA, D. A. O. **Infecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães e lobos-guará: soroepidemiologia e imunodiagnóstico**. 2006. 142f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA SORTE, E. C.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010. DOI:10.4322/rbpv.01902008.

SILVA, J. R.; MACIEL, B. M.; SANTOS, L. K. N. S. S.; CARVALHO, F. S.; ROCHA, D. S.; LOPES, C. W. G.; ALBUQUERQUE, G. R. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in brazilian dogs. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, n. 3, p. 239-246, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.3.239>.

SILVA, N. C. **Avaliação do perfil clínico, laboratorial e molecular de cães suspeitos de ehrlichiose e tratados com doxiciclina na cidade de Uberlândia-MG**. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Uberlândia, Minas Gerais.

SILVA, S. P.; MOTA, R. A.; FARIA, E. B.; CASSEB, A. R.; CASSEB, L. M.N.; DIAS, H. L.T. Comparação das técnicas de ELISA indireto e Imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 431-434, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400003>.

SMITH, P.M.; HAUGHLAND, S. P.; JEFFERY, N. D. Brain abscess in a dog immunosuppressed using cyclosporine. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 675-678, 2007.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. **Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern Cattle fever**. Washington, DC: Bureau of animal Industry, U.S. Departmente of Agriculture, Bulletin, n.1, 1893.

SOARES, R.; RAMOS, C. A.; PEDROSO, T.; BABO-TERRA, V.; CLEVELAND, H.; ARAÚJO, F. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 301–306, 2017. DOI:10.1590/0001-3765201720150556.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1309-1313, 2010.

SOUZA, B. M. P. S.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C. P. M.; UZÊDA, R. S.; ALCÂNTARA, A. C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; GONDIM, L. F. P.; FRANKE, C. R. Prevalência da infecção por Ehrlichia em cães e carrapatos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p.89-93, 2010b. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01902002>.

SOUZA, D. M. B. COLETO, Z. F., SOUZA, A. F., SILVA, S. V., ANDRADE, J. K., GIMENEZ, G. C. Erliquiose transmitida aos cães pelo carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*). **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 15, n. 1/2/3, p. 21-31, 2012.

SOUZA, J. C. P.; MASSARD, C. L.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; FONSECA, A. H. Seroprevalence of *Babesia bovis* (Babés, 1883) in “Médio Paraíba” mesoregion of Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, supl. 1, p. 1-8, 2000.

SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; DAURIA, S. R. N.; CARDOSO, S. M. S.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; DUBEY, J. P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.1, p.1-3, 2003.

SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES, J. S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. **Journal Parasitology**, v. 88, v. 2, p. 408-409, 2002.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010a.

STRITAL, A. D.; IGARASHI, M.; MURARO, L. S.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, T. A.; GARCIA, J. L.; FREITAS, S. H.; AMUDE, A. M. Estudo epidemiológico e avaliação de fatores de risco da infecção por *Toxoplasma gondii* e achados clínico-patológicos da infecção aguda em cães admitidos em um Hospital Escola Veterinário. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 993–998, 2016. DOI:10.1590/s0100-736x2016001000012.

TEIXEIRA, W. C. **Prevalência de anticorpos IgG anti-Neospora caninum e anti-Toxoplasma gondii em bovinos e caninos das mesorregiões Norte e Centro Maranhense, Maranhão, Brasil**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- PE.

TEIXEIRA, W. C.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, J. G.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; GONDIM, L. F. P. Freqüência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.685-687, 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217–1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7).

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

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O. JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. S. M. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.177-180, 2006b.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p.57-61, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01803010>.

ULLMANN, L.S.; GUIMARÃES, F.F.; FORNAZARI, F.; TOMÉ, R.O.; CAMOSSO, L.G.; GRECA, H.; SILVA, R.C.; MENOZZI, B.D.; LANGONI, H. Ações de vigilância continuada, papel do cão como animal sentinela para toxoplasmose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 345-347, 2008.

VALADAS, S.; MINERVINO, A. H. H.; LIMA, V. M. F.; SOARES, R. M.; ORTOLANI, E. L.; GENNARI, S. M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon, Brazil. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 453–457, 2010. DOI:10.1007/s00436-010-1890-2.

VALENTE, P. C. L. G. **Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais**. 2014. 58p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais.

VILELA, J. A. R. **Aspectos epidemiológicos da Babesia canis vogeli em cães da Baixada Fluminense, RJ**. 2012. 86-111f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Seropédica – RJ.

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

ZHU, C. H.; CUI, L. L.; ZHANG, L.S. Comparison of a Commercial ELISA with the Modified Agglutination test for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of naturally infected dogs and cats. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 7, p. 89-95, 2012.

ZULPO, D. L.; DE CARVALHO, J. H. A. L.; CUNHA, I. AL. L.; BARROS, L. D.; TARODA, A.; CAMARGO JÚNIOR, V. E.; SANTOS, H. L. E. P. L.; GARCIA, J. L. Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania spp.*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1897-1906, 2012.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli*, e diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães provenientes do município de Cândido Sales-BA e microrregião**

Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável: Áquila Rhaná Fagundes Ferraz
(Médica Veterinária e mestranda em Ciência Animal do PPGCA-UESC*).

Nome dos demais participantes: Prof. Dra. Fabiana Lessa Silva
(Médica Veterinária, doutora em Ciência Animal, e docente do PPGCA-UESC*).

*PPGCA-UESC (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz).

O (a) Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade detectar a presença de agentes infecciosos nos animais. Ao participar deste estudo o (a) Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) realize a coleta de material hematológico do mesmo. O (a) Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.

O Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Eu, _____,
portador de RG/CPF nº _____, telefone: _____,
residente
à _____,
proprietário/responsável pelo animal _____,
espécie _____, raça _____, sexo _____,
autorizo a utilizar o animal como sujeito de pesquisa para fins didáticos e científicos.

Assinatura do Proprietário

Data: ____/____/____

APÊNDICE II

Número da ficha:

Cidade:

Data:

Título da pesquisa:

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E *Babesia vogeli*, E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM CÃES
PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE CÂNDIDO SALES-BA E MICRORREGIÃO**

Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável: Áquila Rhaná Fagundes Ferraz

Nome dos demais participantes: Prof. Dra. Fabiana Lessa Silva.

Ficha do animal

- Nome do proprietário: _____
 Nome do cão _____ Sexo: () M () F Peso: _____ kg
 Idade: _____ Raça: _____ Castrado (a): () sim () não Vive
 em: () domicilio () abrigo
 Zona: () urbana () rural Tipo de residência: () alvenaria () madeira () taipa () outros _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ Tel.: _____
 1 - O animal tem acesso à rua? () não () sim
 2 - Possui pulgas? () não () sim
 3 - Possui carrapatos? () não () sim
 4 - Faz controle de ectoparasitas? () não () sim, qual tipo? () Oral () ambiental () spot-on () pó () shampoo outros métodos _____
 5 - A vermifugação está atualizada? (menos de 6 meses) () não () sim
 6 - A vacinação está atualizada? () não () sim, qual/quais? _____
 7 - O animal tem hábito de caça ? (Ou há ingestão de carne crua?) () não () sim
 8 - O animal apresenta lesão dermatológica? () não () sim qual/ quais? _____
 9 - Possui animais contactantes em seu ambiente? () não () sim
 10 - Se o animal possui animais contactantes, indique a seguir a quantidade de cada espécie: () cão/cães () gato(s) () bovinos () equinos () ovinos/caprinos () outras espécies. Qual/quais? _____
 11- Qual a frequência de banhos? () semanal () quinzenal () mensal () outros. Qual? ____
 12 - Os banhos são em casa ou em pet shop? () em casa () pet shop
 13 - Ambiente que o animal passa mais tempo: () dentro de casa () área com areia/terra/barro () área com grama () área com cerâmica () área com cimento
 14 - O animal já teve alguma doença anterior? () não () sim. Qual/Quais? _____
 14 - O animal tem alguma queixa de alteração clínica/comportamental no momento? () não () sim. Qual/Quais? (exemplos: vômito, diarreia, falta de apetite, fraqueza, apatia, coceira, sangramentos, etc.)

ANEXO I - Protocolo para extração de DNA

1. Utilizar papa de leucocitos ou 500µL de sangue. Adicionar 500 µL de NaCl 0,9% e homogeneizar suavemente.
2. Centrifugar 10000 rpm por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
3. Adicionar 500 µL de TE (tampão de extração, 250 µL de Tris 20 mM, 250 µL de EDTA 50 mM, 5 µL de proteinase K), vortex.
4. Colocar no banho-maria a 60°C por 45 minutos.
5. Adicionar 200 µL de SDS 1 %, vortex.
6. Aguardar mais 30 minutos no banho-maria a 60°C.
7. Após, acrescentar 350 µL de 180 - fenol/ 160- clorofórmio/ 10 - álcool isoamílico, homogeneizar durante 1 minuto. Ou adicionar 350 µL do composto.
8. Centrifugar por 10 minutos 14000 rpm e transferir o sobrenadante para outro tubo.
9. Adicionar ao no tubo novo 350 µL de clorofórmio e homogeneizar.
10. Centrifugar por 10 minutos 14000 rpm e transferir o sobrenadante para outro tubo.
11. Adicionar 150 µL de acetato de amônio 5 M e 900 µL de etanol 100% (gelado). Agitar manualmente e aguardar 10 minutos no gelo.
12. Centrifugar por 10 minutos 12000 rpm e descartar o sobrenadante.
13. Lavar o precipitado com 1000 µL de etanol 80% (gelado) e centrifugar por 10 minutos 14000 rpm.
14. Descartar o sobrenadante e deixar o pellet secar entre 5 e 10 minutos.
15. Adicionar 80 µL de água milliq e armazenar em freezer a -20°C.

PTK – 5 µL de PTK = 5µg/mL

0,10 mg em 2mL de H₂O