

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Fabiana Raquel Ratzlaff

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM CÃES NECROPSIADOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFSM**

Santa Maria, RS  
2016

**Fabiana Raquel Ratzlaff**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* E  
*Toxoplasma gondii* EM CÃES NECROPSIADOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA  
UFSM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Sangioni

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ratzlaff, Fabiana Raquel  
Detecção de anticorpos Anti-Leishmania infantum,  
Neospora caninum e Toxoplasma gondii em cães  
necropsiados no Hospital Veterinário da UFSM / Fabiana  
Raquel Ratzlaff.- 2016.  
59 f.; 30 cm

Orientador: Luís Antônio Sangioni  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. Protozooses 2. Cães 3. Achados patológicos 4.  
Imunofluorescência Indireta 5. Coinfecção I. Sangioni,  
Luís Antônio II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Fabiana Raquel Ratzlaff. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

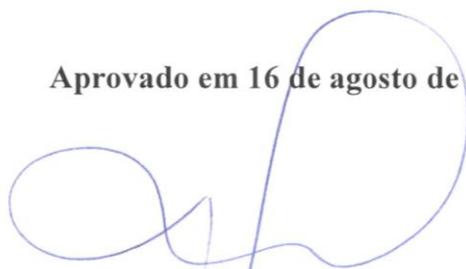
E-mail: fabiratzlaff@yahoo.com.br

**Fabiana Raquel Ratzlaff**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* E  
*Toxoplasma gondii* EM CÃES NECROPSIADOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA  
UFSM**

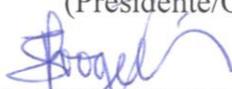
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 16 de agosto de 2016:**



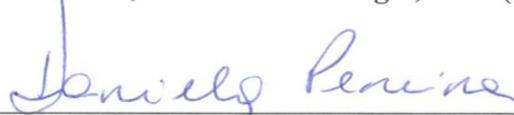
---

**Luís Antônio Sangioni, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)**



---

**Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra. (UFPel)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

À minha família, em especial ao meu pai Valdir José Ratzlaff e minha mãe Nelci Lorena Ratzlaff, que me ensinaram a sempre lutar diante das adversidades e a valorizar cada oportunidade. À minha avó Hilga Dumcke pela minha criação e amor incondicional. Ao meu esposo Daniel Soares de Oliveira pelo apoio e compreensão nos bons e maus momentos de mais esta etapa na minha formação. À minha querida irmã Viviane Ratzlaff pela presença e por partilhar a vida comigo.

## AGRADECIMENTOS

A palavra mais importante que tenho a dizer é GRATIDÃO.

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas, em especial do meu orientador, amigo, conselheiro e maior incentivador Luís Antônio Sangioni, ao qual agradeço pela oportunidade concedida de poder retornar ao meio acadêmico, ao crescimento pessoal e profissional, aos conhecimentos transmitidos, à orientação e à confiança.

Agradeço aos Chefes de Departamento, Prof. Dr. Elio José Santini e Prof. Dr. Clovis Roberto Haselein que me deram a oportunidade de alcançar meu objetivo e obter o título de mestre, concedendo o afastamento parcial do trabalho, sem o qual não seria possível a concretização deste sonho.

Agradeço aos meus padrinhos Sadi Dumcke e Maria Cristina Dumcke pelo amor e por acreditarem na minha capacidade e perseverança.

Agradeço aos amigos que torceram pela minha conquista, amigos de longe e de perto, novos ou antigos, que me apoiaram e entenderam a ausência em muitos momentos.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Santa Maria (LADOPAR-UFSM), pela amizade, pelo apoio, pela estrutura que me permitiu realizar meu experimento com sucesso. Em especial à Jaíne Vasconcellos, Caroline Sobotik de Oliveira, Patrícia Braünig, Prof. Fernanda Silveira Flores Vogel e Prof. Sônia de Ávila Botton, pela ajuda e sugestões sempre bem vindas para engrandecer este trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET), ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) e a Prof. Dra. Sandra Trevisan Beck do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) - UFSM pelo apoio técnico e científico.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pelo ensino e suporte de qualidade que permitiram o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Enfim, gratidão a todos que estiveram ao meu lado nestes anos e são essenciais para que eu me torne uma pessoa cada vez melhor.

“Comece fazendo o que é necessário,  
depois o que é possível,  
e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

## RESUMO

### DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM CÃES NECROPSIADOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFSM

AUTORA: Fabiana Raquel Ratzlaff  
ORIENTADOR: Luís Antônio Sangioni

O cão (*Canis lupus familiaris*) pode ser infectado por uma variedade de protozoários, podendo desenvolver sinais clínicos ou permanecer assintomático. Devido à proximidade desta espécie com o homem e por alguns protozoários apresentarem potencial zoonótico, se realizou um estudo, incluindo *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. *L. infantum*, é responsável por causar a leishmaniose visceral em diversas espécies, abrangendo o cão e o homem, com impactos deletérios na Saúde Pública. O cão é considerado o reservatório urbano deste parasita, e recomenda-se a eutanásia dos soropositivos, inclusive os assintomáticos. *N. caninum* e *T. gondii* são protozoários de ampla distribuição geográfica. Estes agentes, quando acometem os cães, podem causar distúrbios neurológicos, gastrintestinais, respiratórios e musculares. *N. caninum* é um protozoário de grande importância econômica, podendo ocasionar problemas reprodutivos em animais de produção e o cão é o hospedeiro definitivo deste agente. *T. gondii* é um micro-organismo oportunista, de potencial zoonótico, com ocorrência mundial. Os cães, assim como o homem, são considerados hospedeiros intermediários, podendo a infecção ser mais grave em indivíduos imunocomprometidos ou gestantes. Este estudo teve por objetivo pesquisar anticorpos anti-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães necropsiados; bem como determinar a ocorrência da infecção em animais procedentes de Agudo, Jaguari, Júlio de Castilhos, Mata, Santa Maria, Santiago, São Martinho da Serra, São Vicente do Sul e Tupanciretã, municípios da região central do Rio Grande do Sul (RS). Adicionalmente, correlacionou-se os dados epidemiológicos referentes a sexo, idade, raça, procedência e a ocorrência destes protozoários nas estações do ano, com as lesões anatomopatológicas. Os animais foram necropsiados durante a rotina do Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, no período de novembro de 2014 a abril de 2016. Para detecção dos cães sororreagentes, foi realizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), nas amostras armazenadas no banco de soro do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias. Analisou-se 78 amostras, onde 53/78 (67,9%) apresentaram soropositividade, demonstrando a presença de anticorpos para um ou mais dos agentes na população estudada. A ocorrência de anticorpos para *L. infantum*, *N. caninum* e *T. gondii* foi de 26/78 (33,3%), 29/78 (37,1%) e 34/78 (43,5%) respectivamente. Observou-se mono infecções em 5/53 (9,4%) para *L. infantum*, 10/53 (18,8%) para *N. caninum* e 11/53 (20,7%) para *T. gondii*, enquanto que, as coinfeções apareceram em 27/53 (50,9%) dos cães, sendo detectados em 4/53 (7,5%) *L. infantum* + *N. caninum*, 8/53 (15,0%) *L. infantum* + *T. gondii*, 6/53 (11,3%) *N. caninum* + *T. gondii* e 9/53 (16,9%) *L. infantum* + *N. caninum* + *T. gondii*, acometendo animais de diferentes idades, sem predominância de sexo ou raça. Não verificaram-se lesões anatomopatológicas características, caracterizando os animais como assintomáticos, denotando um papel para estes cães de sentinelas destas enfermidades. Este estudo contribuiu para um maior conhecimento da epidemiologia destas protozooses e observou o surgimento da leishmaniose visceral em animais provenientes de áreas consideradas indenes. Além disso, este trabalho poderá subsidiar os serviços de Saúde Pública na adoção de medidas preventivas, evitando possíveis casos de leishmaniose autóctones na região central do RS.

**Palavras-chave:** Protozooses. Cães. Achados patológicos. Imunofluorescência Indireta. Coinfecção.

## ABSTRACT

### DETECTION OF ANTI-*Leishmania infantum* ANTIBODY, *Neospora caninum* AND *Toxoplasma gondii* IN AUTOPSIED DOGS IN VETERINARY HOSPITAL UFSM

AUTHOR: FABIANA RAQUEL RATZLAFF  
ADVISOR: LUÍS ANTÔNIO SANGIONI

The dog (*Canis lupus familiaris*) can be infected by a variety of protozoa and may develop clinical signs or remain asymptomatic. Due to the proximity of this kind with the man some protozoa present zoonotic potential, as researchers studied, including *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *L. infantum*, it is responsible for causing visceral leishmaniasis in several species, including the dog and the man with deleterious impacts on public health. The dog is considered the urban reservoir of the parasite, and it is recommended the euthanasia of seropositive, including asymptomatic. *N. caninum* and *T. gondii* are widely distributed protozoa. These agents, when affecting dogs, can cause neurological, gastrointestinal, respiratory and muscle disturbs. *N. caninum* is a protozoan of great economic importance and may cause reproductive problems in farm animals and the dog is the definitive host of this agent. *T. gondii* is an opportunistic microorganism, a zoonotic potential, with world-occurrence. The dogs as well as humans, are considered intermediate hosts, infection may be more severe in pregnant women and immunocompromised individuals. This study aimed to research anti-*Leishmania infantum* antibodies, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in autopsied dogs; and to determine the occurrence of infection in animals from Agudo, Jaguari, Júlio de Castilhos, Mata, Santa Maria, Santiago, São Martinho da Serra, São Vicente do Sul and Tupanciretã, towns in the central region of Rio Grande do Sul (RS). In addition, there were correlated epidemiological data on sex, age, race, origin and occurrence of these protozoa in the seasons, with the pathological lesions. The animals were necropsied during routine at Pathology Laboratory in the Universidade Federal de Santa Maria, from November 2014 to April 2016. For detection of seropositive dogs, the Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) was performed on stored samples in serum bank Analysis Laboratory in Veterinary Clinics. It analyzed 78 samples, where 53/78 (67.9%) were seropositive, demonstrating the presence of antibodies to one or more of the agents in the population studied. The occurrence of antibodies to *L. infantum*, *N. caninum* and *T. gondii* was 26/78 (33.3%) 29/78 (37.1%) and 34/78 (43.5%) respectively. Mono infections observed in 5/53 (9.4%) of *L. infantum*, 10/53 (18.8%) to *N. caninum* and 11/53 (20.7%) *T. gondii*, while the coinfection appeared in 27/53 (50.9%) of the dogs were detected in 4/53 (7.5%) *L. infantum* + *N. caninum*, 8/53 (15.0%) *L. infantum* + *T. gondii*, 6/53 (11.3%) *N. caninum* + *T. gondii* and 9/53 (16.9%) *L. infantum* + *N. caninum* + *T. gondii*, affecting animals of different ages, without predominance sex or race. There were no pathological characteristic lesions, featuring animals as asymptomatic, indicating a role for these sentinels of dogs these diseases. This study contributed to a better understanding of the epidemiology of protozoa and noted the emergence of visceral leishmaniasis in animals from areas considered harmless. In addition, this work can support the public health services in the adoption of preventive measures, avoiding possible cases of autochthonous leishmaniasis in central RS.

**Keywords:** Protozoa. Dogs. Pathological findings. Indirect Immunofluorescence. Coinfection.

## LISTA DE FIGURAS

### MANUSCRITO

Figura 1 -	Distribuição dos cães soropositivos em mono ou coinfeções de acordo com o agente pesquisado <i>Leishmania infantum</i> , <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> , no período de novembro de 2014 a abril de 2016.....	41
------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Tabela 1 -	Títulos máximos de anticorpos para <i>Leishmania infantum</i> , <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em soro de cães necropsiados no Laboratório de Patologia da UFSM, no período de novembro de 2014 a abril de 2016.....	42
Tabela 2 -	Distribuição de cães positivos para <i>Leishmania infantum</i> , <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> , necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, de acordo com a idade, sexo, procedência, raça e período de realização dos procedimentos clínico-laboratoriais (estação do ano).....	42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL.....	16
2.2	NEOSPOROSE.....	25
2.3	TOXOPLASMOSE.....	30
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO - COINFEÇÕES POR <i>Leishmania infantum</i>, <i>Neopora caninum</i> E <i>Toxoplasma gondii</i> EM CÃES NECROPSIADOS PROVENIENTES DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.....</b>	<b>37</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>38</b>
	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>38</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cão (*Canis lupus familiaris*) é uma espécie animal de convívio muito próximo ao homem, e pode ser infectado por uma grande variedade de agentes etiológicos causadores de diversas infecções. Dentre estes agentes destacam-se os protozoários, que apresentam uma ampla distribuição geográfica, causando enfermidades aos animais ou constituindo um problema à Saúde Pública.

O canídeo pode constituir-se um reservatório para alguns protozoários e servir como fonte de infecção ao homem, ou indicar a circulação de um ou mais agentes, sendo utilizado, desta forma, como animal sentinela (CABEZÓN et al., 2010; ULLMANN et al., 2008). O animal pode ser acometido por apenas um micro-organismo ou a presença de um protozoário pode comprometer o sistema imune, favorecendo a disseminação de mais de um agente, levando a coinfeções, podendo desenvolver sinais clínicos ou permanecerem nos animais de forma assintomática (SOUZA; ALMEIDA, 2008).

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Apresenta distribuição mundial e classifica-se em uma antropozoonose, mantida entre animais reservatórios silvestres e urbanos, insetos vetores e humanos. A transmissão ocorre por mosquitos da família Flebotominae, apresentando-se clinicamente sob as formas cutânea, mucocutânea ou visceral (MEGID, 2016).

No Brasil ocorrem 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) da América Latina, especialmente na região nordeste do País. A doença é relevante na atualidade pela prevalência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas e também considerada emergente em indivíduos imunossuprimidos, assim como os portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV).

O primeiro registro de LV humana no Brasil foi em 1913, no estado do Mato Grosso. A transmissão desta doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, sendo *Lutzomyia longipalpis* descrita como a principal espécie de vetor e o cão doméstico o principal reservatório do agente (BRASIL, 2014).

O estado do Rio Grande do Sul (RS), manteve-se como área livre de transmissão da doença até o ano de 2008, quando foram relatados os primeiros casos autóctones em cães. No ano de 2009 houve o primeiro registro do vetor no estado e foram diagnosticados os primeiros casos humanos, na cidade de São Borja, na região da Fronteira Oeste do RS. Diante disso, houve o desencadeamento de investigações epidemiológicas em vários municípios do RS,

com realização de inquérito sorológico canino, verificação da presença do vetor (*Lutzomyia longipalpis*) e detecção da *Leishmania infantum* em amostras biológicas caninas (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissibilidade, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanos, onde haviam melhores condições de sobrevivência dos vetores e, mais recentemente, em centros urbanos, com adaptação do vetor. Sendo assim, os cães domésticos, passaram a ser considerados os principais reservatórios urbanos (BRASIL, 2104).

A LV no cão é de evolução lenta e o período de incubação pode variar de alguns meses até vários anos. A manifestação clínica da doença está relacionada com a capacidade individual de gerar uma resposta imunológica efetiva, podendo o cão permanecer assintomático. Contudo, estes animais permanecem aptos a atuar como fonte de infecção para os flebotomíneos, ou em alguns casos mais graves podem apresentar um comprometimento orgânico.

O diagnóstico desta enfermidade, baseia-se nos dados epidemiológicos, tendo por base aspectos clínicos e exames laboratoriais, onde o diagnóstico sorológico, é o exame de escolha para utilização em inquéritos epidemiológicos. Devido a sua praticidade e rapidez, os testes imunoenzimático (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) são recomendados pelo Ministério da Saúde. O tratamento de cães soropositivos não deve ser realizado, uma vez que não diminui a importância do animal como reservatório do parasita, desta forma, preconiza-se a eutanásia (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

A neosporose é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum* não sendo confirmado um perfil zoonótico até o momento. Esta enfermidade caracteriza-se por apresentar sinais neurológicos e distúrbios reprodutivos em diferentes espécies animais, principalmente nos cães e bovinos. A ocorrência desta enfermidade em cães tem sido descrita em todos os continentes (DUBEY; SCHARES, 2011) e em animais de todas as idades. No entanto, em mais de 90% dos casos acomete animais com menos de um ano de idade. No Brasil, muitos animais são soropositivos, porém, são raros os relatos de doença clínica. O primeiro diagnóstico de neosporose canina em nosso país, foi relatado em um cão adulto da raça Collie, em 2001, no estado da Bahia, que apresentou paresia de membros posteriores. Os maiores números de cães soropositivos habitam zonas rurais, onde há maior exposição, pelo consumo de tecidos de animais infectados com o parasito, principalmente de bovinos (MEGID, 2016).

O ciclo do protozoário envolve três estágios infecciosos: bradizoítos, taquizoítos e oocistos contendo esporozoítos (DUBEY, 2003). O carnivorismo é o principal modo de transmissão de *N. caninum* para os cães, considerados os hospedeiros definitivos, eliminando oocistos nas fezes (MEGID, 2016).

*N. caninum* é transmitido de forma horizontal, quando são ingeridos, água e alimentos contaminados com oocistos esporulados ou tecidos contendo cistos com bradizoítos. Nos bovinos, a transmissão vertical (transplacentária) é a principal fonte de infecção, podendo causar morte embrionária ou aborto, retorno ao cio, nascimento de bezerros fracos, com sinais nervosos ou com infecção persistente (DUBEY et al., 2002), estimando-se perdas de milhões de dólares no mundo (DUBEY, 2003).

Para a realização do diagnóstico laboratorial, diferentes técnicas vêm sendo empregadas, sendo a RIFI largamente utilizada em cães. Contudo, a soropositividade não significa necessariamente estado de doença. Títulos maiores ou iguais a 800 estão fortemente associados à ocorrência da neosporose aguda.

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, ocorrendo com grande frequência e distribuição mundial, infectando todos os animais homeotérmicos, sendo a toxoplasmose considerada uma zoonose. Apesar da elevada soroprevalência, as manifestações clínicas em humanos e animais são pouco frequentes e estão relacionadas principalmente à presença do parasita em células musculares e neurônios. Observa-se a passagem transplacentária deste protozoário ao feto em mulheres grávidas.

Pode parasitar qualquer célula nucleada, porém apresenta preferência por macrófagos e monócitos. *T. gondii* possui três estágios infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos, havendo formação de cistos teciduais contendo os bradizoítos na forma crônica da infecção, predominantemente no sistema nervoso central (SNC), musculoesquelético, cardíaco, e no globo ocular. A forma de resistência e de disseminação para os humanos e os animais, são os oocistos, eliminados exclusivamente com as fezes dos felinos, com potencial altamente infectante (MEGID, 2016).

A infecção por *T. gondii* em cães é na maioria das vezes assintomática (ARAÚJO et al., 2011; FORTES, 1987; GERMANO et al., 1985), dependendo da magnitude da resposta do sistema imune. Os casos de toxoplasmose clínica comumente estão associados a coinfeções com outras doenças imunossupressoras como por exemplo a cinomose e a erliquiose. No Brasil, a prevalência deste protozoário em cães, pode variar de 8,2 a 88,2%. Estes animais podem ser utilizados como sentinelas, para a infecção humana, onde a convivência entre cães, felinos e o homem é muito estreita (MEGID, 2016).

Os testes sorológicos são essenciais para o diagnóstico da doença e eleitos como teste padrão (DUBEY; LAPPIN, 2006). A RIFI é considerada um método de elevada especificidade e sensibilidade, prática e segura para rotina laboratorial e tem sido empregada na maioria dos estudos epidemiológicos (BRESCIANI et al., 2008).

Considerando a importância destes patógenos para os cães, bem como para a Saúde Pública e pelas perdas econômicas ocasionadas pela presença dos agentes em outras espécies animais, aliado a carência de dados epidemiológicos regionais, este estudo teve por objetivo realizar um levantamento sorológico e determinar a ocorrência de anticorpos contra *L. infantum*, *N. caninum* e *T. gondii* e as coinfeções destes agentes em cães necropsiados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, procedentes da região central do estado do Rio Grande do Sul (RS), bem como correlacionar os dados epidemiológicos referentes a procedência, sexo, idade e raça, com as lesões anatomopatológicas encontradas e o período de realização dos exames laboratoriais (estações do ano). Adicionalmente, buscou-se verificar a presença da infecção por *L. infantum*, em uma área considerada indene no RS.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são enfermidades zoonóticas, que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, tendo como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania* spp., parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. A doença em seres humanos é conhecida vulgarmente como “úlceras de Baurú”, “febre dum-dum”, “botão de Aleppo”, “botão de Bagdá”, dependendo da região de ocorrência.

O agente causador da leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo, é classificado em: ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, sub-gênero *Leishmania* e espécie *infantum*. O micro-organismo apresenta uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados (BRASIL, 2014).

A LV é uma doença de característica crônica, grave, de alta letalidade, cuja mortalidade nos casos humanos não tratados pode alcançar 75 a 85% entre as crianças e 90 a 95% entre os adultos (REY, 2013). A enfermidade ocorre em áreas tropicais e subtropicais, sendo endêmica em 62 países dos quatro continentes, em sua maioria países em desenvolvimento, onde existem 200 milhões de pessoas expostas ao risco. Cerca de 90% dos casos mundiais ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (MELO, 2004).

Nas Américas é conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar, sendo descrita em 12 países da América Latina, onde 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste, mesmo com grande parte dos casos sendo subnotificados. O primeiro registro no Brasil, ocorreu em 1913, quando um caso foi descrito em uma necropsia, de um paciente de Boa Esperança, Mato Grosso. Desde então a doença vem sendo relatada em vários municípios, de todas as regiões do País, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO) e Aracaju (SE) (BRASIL, 2002; BRASIL, 2014; REY, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 1984 e 2002, foram notificados 48.455 casos de LV em humanos, sendo aproximadamente 66% nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Em crianças menores de 10 anos observou-se uma maior frequência, em

torno de 54,4%, onde o sexo masculino é proporcionalmente o mais acometido (60%). Este fato pode ser justificado pela relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, e uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. O envolvimento dos adultos também tem importância na epidemiologia da doença, principalmente nas formas oligossintomáticas ou assintomáticas (BRASIL, 2014).

No período de 2003 a 2009, foram registrados 34.583 casos humanos no País. Sendo que, em 2009 observou-se a ocorrência de 47,5% dos casos na região Nordeste, 19,2% na região Norte, 17,4% na região Sudeste, 7,4% na região Centro-oeste e 0,2% na região Sul, com o primeiro registro de LV humana no estado do Rio Grande do Sul neste mesmo ano (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

O Brasil enfrenta atualmente uma expansão e urbanização da LV com grande número de cães positivos, constituindo-se os reservatórios, em várias cidades de grande e médio porte, significando um crescente problema para Saúde Pública do País (GONTIJO; MELO, 2004).

Os novos comportamentos epidemiológicos podem indicar as transformações demográficas das últimas décadas, apresentando novas situações de vida de segmentos populacionais, que são expostos a inúmeros riscos, como os migrantes, usuários de drogas, grupos marginalizados dos grandes centros urbanos, questões ligadas ao meio ambiente, redução de campanhas contra malária e novos fatores imunossupressivos tais como pacientes positivos para o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), transformando a doença antes eminentemente rural para urbana e periurbana (MELO, 2004).

O movimento de cães entre áreas endêmicas e não endêmicas, juntamente com as mudanças na ecologia do vetor, também contribuem para a dispersão geográfica da LV. O vetor estando disseminado pelo Brasil, e a introdução de cães infectados em áreas não endêmicas, podem resultar em novos focos da doença (DANTAS-TORRES, 2009).

Em 1908, Charles Nicolle descreve a participação dos cães como reservatórios da leishmaniose através de estudos experimentais (REY, 2013). No Brasil, o primeiro caso de LV canina ocorreu na cidade de Araçatuba/SP no ano de 1998 (FUNASA, 2001). Na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção, onde a enzootia canina, tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção tem sido mais prevalente quando comparado ao homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e espécies marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2014). Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de cães na Europa estejam infectados, e que na América do Sul o número de cães infectados também encontra-se muito elevado, com as maiores prevalências registradas no Brasil e Venezuela (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

No cão a LV é de evolução lenta e início insidioso, sendo que o período de incubação pode variar de alguns meses até vários anos. A manifestação clínica é variável dependendo da resposta do sistema imunológico do animal, podendo o cão permanecer de forma assintomática, portador, ou oligossintomático ou evoluir para o óbito (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

*L. infantum* localiza-se preferentemente nos macrófagos do baço, do fígado, da medula óssea e dos órgãos linfóides de homens e animais (REY, 2013). Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada realizada pelo inseto e posteriormente, ocorre a infecção de vísceras (BRASIL, 2014).

Tanto no homem quanto no cão é raro observar o protozoário no sangue, mas estão presentes em 16,3% das biópsias de pele em humanos e 77,6% das caninas; portanto, são muito mais abundantes na pele dos cães (REY, 2013). O sinal clínico mais frequente nos cães é a alopecia, que é causada pela infecção onde há grandes áreas de pele extensamente parasitadas (BRASIL, 2014).

A LV é considerada a forma mais grave, onde o homem e o cão apresentam manifestações clínicas similares, e inespecíficas, que incluem: febre intermitente, anemia, perda de peso progressiva, caquexia, esplenomegalia e hepatomegalia (FEITOSA et al., 2000).

Classicamente a leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas nas orelhas, focinho, cauda e articulações e pelo opaco. Em fase mais avançada, observa-se com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas, vômito e hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre, em geral, a paresia dos membros pélvicos, caquexia, inanição e morte (BRASIL, 2014). As lesões dermatológicas são os sinais clínicos mais comuns (FEITOSA et al., 2000), com cerca de 68% dos cães acometidos apresentando tais alterações (CAVALCANTI et al., 2005).

Cães assintomáticos, permanecem sem sinal clínico sugestivo da infecção e representam a maioria dos casos. Apenas 40% dos animais apresentam sinais clínicos da doença (MEGID, 2016; REY, 2013). Contudo, nos cães oligossintomáticos, observa-se adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco ou ligeira alopecia. Estes fatores dificultam o diagnóstico clínico e é grande o número de animais que permanecem desta forma. Outro fator que dificulta o diagnóstico é a semelhança da leishmaniose com outras enfermidades infecto-contagiosas que acometem o cão. Portanto, o diagnóstico clínico é

presuntivo em animais sintomáticos, ou quando se originam de regiões ou áreas endêmicas (BRASIL, 2014).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença de um hospedeiro/reservatório susceptível e do vetor igualmente susceptível (GONTIJO; MELO, 2004). Os vetores da LV são insetos flebotomíneos. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al., 1998). A primeira é considerada a principal espécie transmissora de *L. infantum* e a segunda, foi descrita como vetor no estado de Mato Grosso do Sul. Popularmente, o inseto é conhecido como mosquito palha, tatuquiras ou birigui (BRASIL, 2014).

A distribuição geográfica do inseto é ampla e está em franca expansão. Nas regiões Norte e Nordeste era encontrado originalmente nas matas. Progressivamente houve adaptação deste inseto no ambiente rural, somando-se a presença de animais silvestres e sinantrópicos neste ambiente. Ao final da década de 80, verificou-se adaptação aos ambientes urbanos. Constatou-se a presença dos vetores em periferias de grandes centros, principalmente na região Sudeste, sendo encontrado no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiros, canis, paiol e também no intradomicílio (BRASIL, 2014). Este fato demonstra a grande capacidade do vetor de se adaptar em vários ambientes aumentando a densidade destes insetos dentro e em torno das habitações humanas, e facilitando a transmissão da doença ao homem e aos animais (REBÊLO, 2001).

Estes vetores são pequenos, apresentando 3mm de comprimento e o corpo revestido de cerdas. Realizam o voo em pequenos saltos e pousam com as asas entreabertas. Os ovos são colocados em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa incidência de luz. O desenvolvimento do ovo em inseto adulto, ocorre de 30 a 40 dias, dependendo da temperatura. Em condições adversas, as larvas de quarto estágio podem entrar em diapausa, com uma parada no desenvolvimento, que possibilita a resistência até um período mais favorável ao seu desenvolvimento. As fêmeas são hematófagas obrigatórias com estimativa de vida de 20 dias. Realizam repasto sanguíneo nos humanos e em várias espécies de animais vertebrados. O cão é considerado a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico (BRASIL, 2014; GHARBI et al., 2015).

BARATA et al. (2005), verificaram que na cidade de Porteirinha/MG houve uma maior frequência de vetores no peridomicílio (53,3%), e *L. longipalpis* foi a espécie predominante (65,1%), com um comportamento oportunista. O díptero alimentava-se de várias espécies: galinhas e equinos (26,3%), seguido por roedores (15,8%), cães (13,2%),

bovinos (10,5%) e homem (5,3%). Em Montes Claros/MG, em uma verificação entomológica, dentre as 16 espécies do vetor encontradas, a espécie *L. longipalpis* também representou maioria (74%), coincidindo os bairros com maior densidade vetorial com uma maior taxa de prevalência da LV (MONTEIRO et al., 2005).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna, ficando em repouso durante o dia em locais sombreados e úmidos (RIO GRANDE DO SUL, 2011). Há indícios de que o período de maior transmissão da LV, ocorra durante e logo após a estação chuvosa onde se verifica um aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2014). Em um estudo sobre frequência horária e sazonalidade de *L. longipalpis*, realizado na Ilha de São Luís/MA, nos ambientes peri e intradomiciliar, entre as 18h e 6h, verificou-se uma alta frequência destas espécies, em todos os meses do ano, tendendo a ser mais abundante no período chuvoso (57,2%), com maior ocorrência entre 18h e 22h no peridomicílio e entre 20h e 2h no intradomicílio (REBÊLO, 2001).

No estado do Rio Grande do Sul, até 2008, as capturas de flebotomíneos eram restritas nas áreas silvestres, onde haviam relatos de leishmaniose tegumentar. Com o surgimento da LV em um cão no município de São Borja, também se evidenciou a presença de *L. longipalpis* (SOUZA et al., 2009), desencadeando levantamento entomológico na região da fronteira oeste do estado. Entre 2008 e 2011, em sete municípios do RS (Porto Xavier, Pirapó, Garruchos, São Borja, Itaqui, Uruguaiana e Barra do Quaraí), foram coletadas 1.249 amostras de dípteros sendo identificados 200 espécimes de *L. longipalpis*. Estes municípios foram considerados como áreas de risco para a enfermidade. Áreas de risco podem ser divididas em áreas com vetor e sem vetor. No RS estas áreas são as localizadas na fronteira com a Argentina e as áreas indenens são os municípios do estado que não estão situados na fronteira com a Argentina ou não são vizinhos às áreas com vetor. A investigação entomológica nestas outras áreas deve ser instaurada quando houver casos humanos ou caninos suspeitos (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

Mesmo com a dispersão dos flebotomíneos para quase todas as regiões do Brasil, a ausência do vetor em áreas com casos de LV, sugere outros modos de transmissão da forma infectante (DANTAS-TORRES, 2009). Alguns autores admitem a hipótese da transmissão por carrapatos e pulgas, mas ainda não se comprovou se eles apresentam competência vetorial (COUTINHO; LINARDI, 2007; DANTAS-TORRES, 2011; FERREIRA et al., 2009). O cão poderia se infectar ingerindo carrapatos infectados, ou através de mordeduras, cópula, ingestão de vísceras, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia (DANTAS-

TORRES, 2011). O período de transmissão ocorre enquanto houver parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro (BRASIL, 2014).

O repasto sanguíneo feito pela fêmea do inseto, é o momento que ela pode se infectar, ingerindo macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania spp.* No trato digestivo do inseto, os macrófagos se rompem e liberam o parasito que se reproduz por divisão binária, diferenciando rapidamente em formas flageladas (promastigotas). Posteriormente se multiplicam e colonizam o esôfago e faringe do vetor, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas. A forma infectante é liberada juntamente com a saliva do inseto quando realizam um novo repasto sanguíneo. Estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear. No interior dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento do macrófago, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2014).

O diagnóstico da LV compreende a associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. O diagnóstico clínico deve ser confirmado laboratorialmente. A confirmação é dada baseando-se em exames sorológicos, parasitológicos ou moleculares (DIVE, 2015; MEGID, 2016).

O diagnóstico laboratorial da enfermidade no cão e no homem são semelhantes, sendo o diagnóstico sorológico o método de escolha para utilização em inquéritos epidemiológicos, pela praticidade, rapidez e facilidade de conservação da amostra. Atualmente, estão disponíveis e aprovados pelo Ministério da Saúde, a técnica de ELISA, bastante sensível e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) que apresenta alta sensibilidade e especificidade, as quais expressam os níveis de anticorpos circulantes. O laboratório de referência no RS, e único, que tem seus resultados validados pelo Ministério da Saúde, é o Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central de Saúde Pública (IPB-LACEN/RS), o qual envia os laudos diretamente ao Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). Este por sua vez envia os dados para a Coordenadoria Regional de Saúde ao qual o município solicitante pertence (RIO GRANDE DO SUL, 2011). Com amostras de soro do animal também é possível realizar a reação de fixação do complemento (RFC) e aglutinação direta (MEGID, 2016).

A problemática para os serviços de Saúde Pública, quanto ao diagnóstico da LVC, se deve a três fatores: variedade de sinais clínicos semelhantes a outras enfermidades infecto-contagiosas; alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível. Até o ano de 2011, o Ministério da Saúde recomendava o teste

ELISA como triagem (*screening*) e a RIFI como confirmatória. A partir de 2012, após a emissão de uma Nota Técnica Conjunta 01/2011, orientou-se para a utilização de um teste rápido imunocromatográfico (DPP) como triagem e o ELISA como confirmatório da doença (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

Em um estudo realizado em uma área considerada indene para LV no RS, foi comparado a utilização das técnicas sorológicas conforme protocolo antigo recomendado pelo Ministério da Saúde para diagnóstico da doença e a recomendação atual. Neste estudo constataram que a sensibilidade do teste diminuiu 20%, mas a especificidade aumentou em 27,7% comparando-se os protocolos. Contudo, observaram melhor desempenho, com aumento de especificidade, quando associaram em série, os resultados positivos de DPP e RIFI usando o ELISA como teste confirmatório (HIRSCHMANN et al., 2015).

A LV é marcada por uma estimulação policlonal de linfócito B, que resulta em hipergamaglobulinemia e elevada produção de anticorpos, o que facilita o diagnóstico por testes sorológicos. Estes métodos são considerados não invasivos, e ótimas ferramentas para identificação de cães infectados. A RIFI possui elevada sensibilidade (98 a 99,2%) e especificidade (70 a 94%) (MEGID, 2016) mas como limitação pode apresentar reação cruzada principalmente entre leishmaniose visceral, tegumentar e *Trypanossoma cruzi* (BRASIL, 2006).

Por este motivo, deve-se atentar aos sinais clínicos se houverem, aliados aos aspectos epidemiológicos como: procedência do animal, presença de vetores (flebotômíneos e triatomíneos), contato com animais silvestres, dentre outros. O diagnóstico definitivo deve ser confirmado por outra técnica como a PCR (LUCIANO et al., 2009). Silva (2009) concluiu que anticorpos vacinais também podem causar outra forma de reação cruzada. Na RIFI os cães são considerados positivos quando utilizados o ponto de corte com títulos iguais a 40. Em casos humanos, consideram-se positivos os títulos  $\geq 80$  (MEGID, 2016).

Um sistema de monitoramento da LV pode contribuir para a vigilância da enfermidade e detectar novas áreas de ocorrência da doença. O Ministério da Saúde preconiza a realização de inquérito amostral sorológico canino censitário, quando a prevalência for maior ou igual a 2% (BRASIL, 2003). Na cidade de Araçatuba/SP, 23,4% (23/98) dos cães testados apresentaram positividade (GENNARI et al., 2006) Em Bauru/SP, em cães do Centro de Controle de Zoonoses, região endêmica para leishmaniose, foi encontrado 65% de positividade (65/100) na RIFI (GRECA et al., 2010), Na região metropolitana de Belo Horizonte foi encontrada a prevalência de 64,6% (SILVA et al., 2001). No município de Teresina/PI a soropositividade foi de 77,9% (413/530) (LOPES et al., 2011). No município de

Lavras/MG, a soropositividade foi abaixo dos dados anteriores, 0,3% (1/300), não havendo evidencia de casos autóctones neste município (GUIMARÃES et al., 2009). Na Itália, na região de Campania, foi verificada a soropositividade de 21% (222/1058), comprovando a endemicidade da leishmaniose visceral na região estudada (CRINGOLI et al., 2002).

O diagnóstico parasitológico é o método direto que permite a visualização do parasito obtido de material biológico de punções: hepática, linfonodos, esplênica, medula óssea e biópsia ou escarificação da pele. É considerado um procedimento simples, porém invasivo. Este procedimento oferece risco ao animal, sendo impraticável em programas de Saúde Pública, quando um grande número de animais deve ser avaliado em um curto espaço de tempo. Devem ser confeccionadas 4 lâminas de cada material e observar ao menos 20 campos em microscópio óptico para se obter um diagnóstico confiável. É um método seguro, podendo observar a forma amastigota, apresentando especificidade de aproximadamente 100%. A sensibilidade do teste dependerá do grau de parasitemia do hospedeiro, tipo do material coletado, o tempo disponível para realização da leitura da lâmina e a experiência do técnico, estando em torno de 80% em cães sintomáticos e abaixo de 80% nos casos soropositivos assintomáticos (BRASIL, 2014; MEGID, 2016).

O isolamento em meio de cultura (*in vitro*) é realizado em meio contendo ágar acrescido de sangue de ovino desfibrinado. Neste ambiente ocorre a transformação da forma amastigota em promastigota. O meio de rotina utilizado é denominado NNN (Novy-MacNeal-Nicolle). O cultivo deve ser examinado semanalmente, durante 4 a 6 semanas, em caso de cultura positiva, encaminha-se material para laboratório de referência, para se realizar a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida.

As técnicas biomoleculares para detecção do material genético (DNA) do parasita, têm demonstrado boa perspectiva, principalmente a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), pois apresenta sensibilidade e especificidade muito elevadas, próximas a 100%. Entretanto, o custo inicial pode ser elevado, e desta forma, constituir um fator limitante para utilização na rotina de diagnósticos (MEGID, 2016).

Quando se quer determinar a prevalência de uma protozoose, também se analisam as variáveis epidemiológicas consideradas como fatores de risco: raça, sexo, faixa etária, procedência. Segundo o Ministério da Saúde, estes dados apresentam pequena variação quando se avalia a ocorrência da LVC. Lopes et al. (2011) e Coelho et al. (2013) não encontraram associação da soropositividade para *L. infantum*, com o sexo e a raça dos animais testados, sugerindo que machos e fêmeas com ou sem raça definida, têm as mesmas condições

de se infectarem. Com relação a idade, a infecção foi mais comum em cães até dois anos de idade.

Em uma avaliação de diferentes raças, Cringoli et al. (2002) constataram que a raça Yorkshire foi menos acometida, sugerindo que como a epidemiologia da leishmaniose está intimamente associada a biologia do vetor, o estilo de vida dos cães está provavelmente envolvido nesta correlação. Raças miniaturas poderiam ser menos acometidas por viverem dentro dos domicílios (GONTIJO; MELO, 2004).

As drogas tradicionalmente utilizadas para o tratamento da doença são: antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol. As tentativas de tratamento em cães têm apresentado baixa eficácia, induzindo a remissão temporária dos sinais clínicos, não prevenindo a ocorrência de recidivas, tendo efeito limitado na infectividade do vetor, ocorrendo o risco de aumento da pressão de seleção para parasitas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano, e não diminui a importância do cão como reservatório do parasita (BRASIL, 2014; MEGID, 2016).

No Brasil não se recomenda o tratamento dos cães infectados e de outros animais suscetíveis, com diagnóstico laboratorial reagente, apresentando ou não sinais clínicos da doença. Nestes casos deve-se orientar a eutanásia dos animais, e realizar a notificação de todos os casos às autoridades sanitárias do município. Esta enfermidade está incluída como uma das doenças de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde. Desde 2008, o tratamento de cães com leishmaniose passou a ser proibido em nosso país, por força da Portaria Interministerial número 1.426, que proíbe o tratamento com fármacos de uso humano e não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MEGID, 2016).

O cão que for diagnosticado positivo para leishmaniose, será considerado animal reservatório da doença, devendo ser eutanasiado, seguindo-se a resolução número 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre os métodos de eutanásia aceitos em animais (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

Em municípios silenciosos, ou seja, onde não há histórico de registro de casos autóctones de leishmaniose visceral em humanos e em cães, mas há risco de introdução da doença pela vulnerabilidade e pela receptividade da área, os serviços de saúde devem executar as ações de vigilância e prevenção, visando reduzir o risco de infecção.

As ações profiláticas dirigidas à população, incluem a utilização de mosquiteiros, telagem de portas e janelas, uso de repelentes, evitar exposição no crepúsculo e à noite. Contudo, no combate ao vetor, se incentiva o manejo adequado do meio ambiente incluindo o

saneamento ambiental, a limpeza urbana, a eliminação de fontes de umidade, poda de árvores, aumentando a incidência solar, limpeza periódica dos abrigos dos animais, diminuindo, desta forma, a proliferação do inseto. Para os cães, recomenda-se os testes sorológicos antes da doação de animais abandonados, uso de telas em canis, bem como o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%. A utilização de vacinas como medida profilática ainda requer mais estudos que comprovem a efetividade.

Atualmente, pelas características epidemiológicas e pelos vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LV, as estratégias de controle ainda são pouco efetivas e permanecem centradas no diagnóstico e no tratamento precoce dos casos humanos, na redução dos vetores, na eliminação dos reservatórios e nas atividades de educação em saúde (BRASIL, 2016).

## 2.2 NEOSPOROSE

A neosporose é causada pelo protozoário *Neospora caninum*, um importante agente patogênico para os cães e os bovinos, causando ocasionalmente, infecções clínicas em equinos, caprinos, ovinos, cervos, búfalos e galinhas. Além disso, anticorpos para *N. caninum*, foram encontrados em raposas, coiotes, camelos e felídeos. O cão (*Canis lupus familiaris*) é considerado o único hospedeiro definitivo conhecido no ambiente doméstico (DUBEY, 2003; LINDSAY et al., 1999). No meio silvestre são reconhecidos como hospedeiros definitivos os coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), dingos australianos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobos cinzas (*Canis lupus*). Estima-se que exista uma maior diversidade de hospedeiros envolvidos no ciclo biológico (DUBEY; SCHARES, 2011).

Associa-se a infecção em animais sintomáticos aos distúrbios de ordem neurológica em cães e a uma importante causa de aborto em bovinos (BERTOCCO et al., 2008). Diante disso, o diagnóstico desta enfermidade é de fundamental importância para realizarem-se medidas de controle e profilaxia desta doença.

Em função do sucesso na infecção de dois macacos *Rhesus* (*Macaca mulata*) com *N. caninum*, investigou-se se este protozoário poderia apresentar potencial zoonótico, porém em estudos em humanos, não se encontrou anticorpos para *N. caninum* ou se encontrou com frequência e títulos muito baixos (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999; TRANAS et al., 1999; TREES; WILLIAMS, 2000), não constituindo a neosporose, até o momento, em uma doença com impacto zoonótico (DUBEY, 2003).

A ocorrência deste protozoário foi reconhecido pela primeira vez em 1984 em cães da Noruega (BJERKÅS et al., 1984) e descrito como um novo gênero e espécie (*Neospora caninum*) em 1988. Neste mesmo ano, nos Estados Unidos, isolaram e descreveram um protozoário em filhotes de cães apresentando paralisia, sintomatologia semelhante aos dos cães da Noruega (DUBEY et al., 1988). No Brasil, em 2001, foi realizado o primeiro diagnóstico de nosporose canina, em um cão da raça Collie, macho, adulto, apresentando paresia dos membros posteriores, com elevado título de anticorpos anti-*N. caninum* (1:1.600) que foi a óbito após 10 dias de tratamento (MEGID, 2016).

*N. caninum* é um coccídio, parasita intracelular obrigatório, pertencente ao reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoa e família Sarcocystidae (MEGID, 2016), com duas espécies descritas: *N. caninum*, isolado de cérebro de cão (DUBEY et al., 1988) e *N. hughesi* (MARSH et al., 1998) isolado de cérebro e medula espinhal de equino com mieloencefalite.

O ciclo de vida, é dividido em três estágios infecciosos: taquizoítos, cistos teciduais (contendo bradizoítos) e oocistos (contendo esporozoítos). Taquizoítos e cistos teciduais são encontrados nos hospedeiros intermediários, ocorrendo intracelularmente (DUBEY et al., 2002), sendo a localização principal dos cistos no sistema nervoso central (SNC). Contudo, há relatos de cistos em músculos de bovinos e de cães naturalmente infectados (PETERS et al., 2001).

Os taquizoítos altamente infectantes, representam a forma de multiplicação rápida, apresentam formato semilunar ou ovóide. Esta fase se divide assexuadamente por um processo de endodiogenia, capaz de infectar uma grande variedade de células do hospedeiro, incluindo neurônios, miócitos, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e células renais. A resposta imune do hospedeiro e a presença de outros fatores fisiológicos, induzem a entrada dos taquizoítos nas células e a diferenciação em bradizoítos, estabelecendo a infecção pela presença dos cistos (HEMPHIL et al., 1999; PETERS et al., 2001). Cada cisto, tem centenas de bradizoítos que podem permanecer latentes no hospedeiro por longos períodos, sem causar nenhuma manifestação clínica, apresentando multiplicação lenta e reprodução assexuada. A espessura da parede do cisto pode ser de até 4µm, diferentemente do cisto de *T. gondii* cujas paredes geralmente não ultrapassam 1µm (MEGID, 2016).

A ingestão oral de cistos que contêm bradizoítos por hospedeiros carnívoros promove diferenciação sexual do parasito (DUBEY et al., 2002). Os oocistos são formados pela reprodução sexuada no intestino do hospedeiro definitivo. Esta estrutura é excretada nas fezes

na forma não esporulada. Após 2 a 3 dias, sofre esporulação e passa a apresentar no interior 2 esporocistos, cada qual contendo 4 esporozoítos.

A transmissão de *N. caninum* ocorre por dois mecanismos: horizontal e vertical. A forma horizontal ocorre quando são ingeridos oocistos esporulados através da água e alimentos ou tecidos com cistos contendo bradizoítos, ocorrendo então a formação de cistos teciduais no hospedeiro intermediário. O ciclo completa-se quando o hospedeiro definitivo ingere os tecidos contendo estes cistos (MEGID, 2016).

A transmissão vertical, infecção congênita ou infecção via transplacentária, ocorre quando a mãe transmite o parasito para os descendentes, sendo esta a forma de transmissão mais importante em bovinos (DUBEY et al., 2007). A transmissão vertical pode ser subdividida em transmissão transplacentária endógena e transmissão transplacentária exógena. Na fase endógena a vaca persistentemente infectada transmite o parasito para o feto, possivelmente pelo rompimento de um cisto tecidual contendo bradizoítos. Na exógena, a vaca adquire a infecção durante a gestação por ingestão de oocistos esporulados. Em cadelas, a parasitemia e a infecção transplacentária parecem ser originadas da ingestão de tecido animal infectado ou da reativação de cistos. A infecção transplacentária pode causar morte neonatal ou alterações neuromusculares em filhotes após infecção congênita. O abortamento em cães é incomum (MEGID, 2016). A transmissão vertical por si só não mantém o parasita nos cães (BARBER; TREES, 1998).

Infecções por *Neospora caninum* foram relatadas em vários países. A avaliação de estudos soroepidemiológicos demonstra uma ampla variação na prevalência, dependendo do país, região, tipo de teste ou ponto de corte utilizado, amostragem ou população estudada (DUBEY, 2003). Anticorpos contra *N. caninum* em cães foram encontrados em 37,8% (121/320) na Argentina (BASSO et al., 2001), 22% (44/200) na Nova Zelândia (REICHEL et al., 1998), 10% (15/150) na Turquia (COSKUN et al., 2000), 6,4% (67/1.058) na Itália (CRINGOLI et al., 2002), 12% (14/120) em cães urbanos e 26% (21/81) em cães rurais do Chile (PATITUCCI et al., 2001).

No Brasil, esta grande variação não é diferente, porém são raros os relatos de doença clínica (MEGID, 2016). Verificou-se a ocorrência de 3,2% (17/530) em Teresina/PI ( LOPES et al., 2011); 6,7% (11/163) em Uberlândia/MG (MINEO et al., 2001); 8,3% (13/157) em cães urbanos de Monte Negro/RO (CAÑON-FRANCO et al., 2003); 8,4% (24/286) em Campina Grande/PB (AZEVEDO et al., 2005); 8,48% (25/295) em Jaboticabal/SP (VARANDAS et al., 2001); 10% (50/500) em cães domiciliados e 25% (152/611) em cães de rua em São Paulo/SP (GENNARI et al., 2002); 14% (14/100) em Bauru/SP (GRECA et al., 2010); 15,6% (53/339)

dos cães em Pelotas/RS, sendo 5,5% (6/109) urbanos e 20,4% (47/230) de área rural (CUNHA FILHO et al., 2008); 15,7% (17/108) em Araçatuba/SP (BRESCIANI et al., 2007); 32,9% (65/197) em Goiânia/GO (BOAVENTURA et al., 2007); 45% em cães capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Luís/ MA (TEIXEIRA et al., 2006).

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado por métodos sorológicos ou parasitológicos (SILVA, 2005). Provas sorológicas indiretas para detecção de anticorpos, como a RIFI e o ELISA são os principais testes utilizados. A RIFI foi o primeiro método para o diagnóstico de *N. caninum*, utilizando os taquizoítos como antígenos, sendo este considerado um teste padrão ouro para diagnóstico sorológico deste agente. Tem-se demonstrado que a RIFI apresenta uma baixa ocorrência de reação cruzada com outros parasitas (TREES et al., 1999).

A maioria dos animais soropositivos são assintomáticos, porém títulos iguais ou superiores a 800, estão muitas vezes associados a doença clínica. Contudo, cães expostos repetidas vezes aos tecidos de bovinos infectados com o parasito podem apresentar títulos iguais ou superiores a 800, sem a manifestação clínica da doença (MEGID, 2016). Testes sorológicos devem ser interpretados com precaução, uma vez que os níveis de anticorpos flutuam, principalmente para parasitos que formam cistos teciduais e podem recrudescer com uma imunossupressão (WALDNER et al., 1998). Níveis de anticorpos específicos podem persistir durante toda a vida, muitas vezes ficando abaixo do limite de detecção dos testes sorológicos (DUBEY et al., 2006).

O diagnóstico conclusivo em cães com alterações neurológicas ou neuromusculares é dado com base no exame histopatológico somando-se a imuno-histoquímica e PCR dos tecidos afetados. Elege-se os seguintes tecidos para a realização dos testes: tecido nervoso central, coração e musculatura esquelética. Pela similaridade clínica é importante se fazer o diagnóstico diferencial da toxoplasmose e da cinomose (MEGID, 2016).

As infecções clínicas e sub-clínicas de *N. caninum* em cães (*Canis lupus familiares*) são epidemiologicamente importantes devido ao cão doméstico ser o principal hospedeiro do parasito, capaz de contaminar o ambiente, representando fator de risco para a ocorrência de abortos em bovinos (PARE et al., 1998).

Os casos de neosporose mais graves ocorrem em cães jovens, filhotes congenitamente infectados (DUBEY; LINDSAY, 1996), o qual, desenvolvem uma paralisia dos membros posteriores que evolui para uma paralisia ascendente. Os sinais neurológicos dependem do local parasitado. Os membros posteriores são mais severamente acometidos que os anteriores. Pode-se observar também a dificuldade de deglutição, paralisia de mandíbula, flacidez

muscular, atrofia muscular, insuficiência cardíaca. Praticamente todos os órgãos podem estar envolvidos, incluindo a pele com dermatite grave, nódulos vesiculares, úlceras, alopecia, apresentando grande quantidade de *N. caninum* (DUBEY, 2003).

Cães de qualquer idade e sexo podem ser infectados. Cadelas infectadas sem sinais clínicos podem transmitir o protozoário a seus fetos em sucessivas ninhadas. Quanto a raça, cães de qualquer raça podem ser acometidos, porém a maioria dos casos descritos foram em cães da raça Labrador Retrievers, Boxer, Galgos, Golden Retrievers e Basset (DUBEY, 2003).

Avaliando possíveis fatores de risco associados com a soropositividade para *N. caninum*, Cunha Filho et al. (2008), constataram que cães rurais têm 4 vezes mais chances de se infectarem quando comparados com os animais de zona urbana, demonstrando que a origem do cão é um dado importante na epidemiologia da doença. Os cães do meio rural podem ter maiores chances de ingerirem carcaças, fetos bovinos abortados e restos placentários. Comparando-se o tipo de criação de bovinos, observaram que cães provenientes de propriedades de animais de corte, apresentaram 2,8 vezes mais chances de infecção, fato que pode estar associado ao maior controle sanitário do rebanho de bovinos de leite. Cães utilizados para o pastoreio apresentaram maior risco do que cães de companhia. Neste estudo, o sexo e a raça, não foram associados com a ocorrência do parasito, concordando com a afirmação de Dubey e Lindsay (1996).

No Japão, Sawada et al. (1998), detectaram 31% (15/48) dos cães soropositivos do meio rural associados à exploração leiteira e 7% (14/198) em cães de área urbana. Na Holanda, detectaram 23,6% (36/152) em cães rurais, em contrapartida, 5,5% (19/344) em cães urbanos (WOUDA et al., 1999).

Quanto a idade, observaram que animais com mais de três anos, tiveram um risco quatro vezes maior de serem soropositivos, indicando a importância da transmissão horizontal nesta espécie. Barber (1998), relata que a taxa de transmissão vertical em cães é baixa, onde 80% da prole de mães soropositivas não é infectada até o nascimento, sendo a transmissão horizontal mais frequente, justificando as elevadas taxas de soroprevalência encontradas em populações caninas.

Outros fatores de risco, foram constatados por Dantas et al. (2013) e incluem a presença de ratos e a frequência na limpeza do ambiente onde os cães permaneciam. Cães domiciliados com a presença de ratos apresentaram 2,34 mais chances de serem soropositivos. No ciclo silvestre, os roedores naturalmente infectados, funcionam como reservatórios, desempenhando importante papel na manutenção e disseminação do agente pois são animais

cosmopolitas, presentes no ambiente urbano, rural e selvagem. Estes animais são presas fáceis, havendo a possibilidade do cão contrair a infecção ao ingerir o roedor (GONDIM, 2006; JENKINS et al., 2007; MEERBURG et al., 2012)

Quanto a frequência da limpeza do ambiente, Dantas et al. (2013) afirmaram que uma limpeza diária diminuiria em 2,77 as chances de infecção para o cão. Os oocistos de *N. caninum* são inviabilizados após tratamento com hipoclorito de sódio a 10%, durante uma hora a temperatura ambiente. Este desinfetante é recomendado na descontaminação do ambiente (ALVES NETO, 2009).

Não há vacina contra a neosporose para cães. O controle da doença constitui em evitar o fornecimento de qualquer tecido de origem animal que não tenha sido submetido a altas temperaturas, sendo a ração uma boa opção para alimentação de cães. Estes hospedeiros não devem ter acesso a fetos bovinos abortados, ou restos de placentas, o que representa uma importante via de transmissão do protozoário para os cães (MEGID, 2016).

Além disso, Bertocco et al. (2008) sugeriram evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas que tenham apresentado sintomatologia compatível ou mesmo que tenham produzido filhotes infectados e doentes.

O tratamento de eleição para cães com infecção aguda, consiste na associação de trimetoprim/sulfonamidas (10 a 20 mg/kg, VO, a cada 12 horas) e clindamicina (15 a 22 mg/kg, VO, a cada 12 horas), ou somente clindamicina, recomendando-se manter a medicação por pelo menos 3 semanas (MEGID, 2016).

### 2.3 TOXOPLASMOSE

*Toxoplasma gondii* é o protozoário causador da toxoplasmose, uma das parasitoses mais comuns existentes que acomete todos os animais homeotérmicos (mais de 30 espécies de aves e 300 de mamíferos comprovadas) e os humanos. Admite-se que 1/3 da população humana seria sorologicamente positiva, sob a forma de infecção crônica assintomática (REY, 2013). Apesar da elevada soroprevalência, as manifestações clínicas em humanos e animais não são frequentes e estão relacionadas principalmente a presença do parasita em células musculares, neurônios e infecções congênitas em mulheres (MEGID, 2016).

Trata-se de um coccídio, intracelular obrigatório, responsável por uma zoonose de distribuição mundial, tendo como hospedeiros definitivos os felídeos que causam a contaminação ambiental, completando o ciclo e eliminando oocistos nas fezes, apresentando uma grande importância na Medicina Veterinária e na Saúde Pública. Este protozoário

pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma*, espécie única *T. gondii* (LEAL; COELHO, 2014).

O ciclo de vida é heteroxeno facultativo, dividido em duas etapas distintas, a enteroepitelial e a extra-intestinal. A primeira ocorre somente em felinos, que são os hospedeiros definitivos, com produção de oocistos infectantes após esporulação (DUBEY et al., 1970; FRENKEL et al., 1970). O ciclo extra-intestinal ocorre em qualquer hospedeiro vertebrado endotérmico, formando cistos teciduais (FRENKEL, 1970).

As três formas infectantes de *T. gondii* são os bradizoítos, presentes nos cistos teciduais, os taquizoítos são a forma proliferativa e os esporozoítos encontrados nos oocistos esporulados eliminados nas fezes dos gatos (DUBEY et al., 1970; FRENKEL et al., 1970). Os taquizoítos e bradizoítos podem ser observados em vários tecidos de vertebrados, exceto nas hemácias de mamíferos. Os taquizoítos podem ser encontrados em líquidos orgânicos como saliva, leite, linfa, sêmen, urina e transudato peritoneal. Quando o parasita localiza-se nos órgãos reprodutores masculinos e femininos de hospedeiros intermediários, pode causar efeitos indesejáveis na função reprodutiva. Em humanos, pode afetar a reprodução feminina e causar infertilidade temporária masculina. Estudos revelaram alta prevalência de toxoplasmose em homens estéreis. Existem evidências sobre transmissão venérea do agente (DALIMI; ABDOLI, 2013).

Os taquizoítos geralmente chegam a luz intestinal através da ingestão de alimentos ou água contaminados, invadem a circulação sanguínea e linfática, disseminando-se pelos tecidos pelas células do sistema mononuclear fagocitário. Se reproduzem na célula parasitada, até a sua destruição e liberação dos taquizoítos. O aparecimento de sinais clínicos é dependente do processo de agressão causado pelo parasita e da resposta do hospedeiro (MEGID, 2016).

*T. gondii* e *N. caninum*, são parasitas relacionados estruturalmente, geneticamente e imunologicamente e causam doenças distintas, sendo a toxoplasmose uma das principais doenças de ovinos e humanos e não de bovinos. A neosporose por sua vez, é importante para bovinos e ovinos, não havendo evidência de infecção humana (DUBEY, 2003).

*T. gondii* foi descrito em 1908, por Splendore, em coelhos, em São Paulo e quase que ao mesmo tempo, por Nicolle e Manceaux no roedor Gondi, na Tunísia, no norte da África. Os primeiros casos humanos, foram detectados em 1923, na Tchecoslováquia e em 1927, no Brasil, Magarinos Torres detectou a infecção, porém, classificou o parasita como *Encephalitozoon* (REY, 2013). A primeira descrição da doença em cães ocorreu na Itália, em um animal que apresentou anorexia, fraqueza, anemia, emagrecimento, desidratação, atrofia dos músculos, dispnéia, diarreia, vômitos e pulso fraco (MELLO, 1910). No ano seguinte, no

Brasil, foi descrito um caso diagnosticado pós morte. Foi observado organismos viáveis com características de *T. gondii* nos pulmões, baço, fígado, rins e de medula óssea (CARINI, 1911).

A sua importância para a Saúde Pública, se refere, por ser uma infecção cosmopolita, muito difundida, por acometer fetos e crianças jovens, e constituir uma infecção oportunista, que se manifesta com gravidade, sempre que houver uma imunodeficiência de qualquer natureza. Esta enfermidade tem uma relevância para os portadores do vírus HIV, onde estima-se que 30% dos pacientes que possuam a coinfeção, desenvolverão encefalite toxoplásmica.

Em pessoas adultas, é capaz de determinar um quadro febril, com linfadenopatia e nas crianças pode ocasionar uma forma subaguda de encefalomielite e coriorretinite. A forma congênita é particularmente grave, podendo ser fatal (REY, 2013).

Investigações relativas à toxoplasmose animal, são fundamentais, tendo em vista o potencial zoonótico e a patogenicidade em animais de produção e de companhia (GARCIA et al., 1999a e 1999b). Os felídeos são os únicos hospedeiros que eliminam oocistos pelas fezes (MILLER et al., 1972). Estas formas sofrem esporulação no meio ambiente, e tornam-se infectantes de 1 a 5 dias (DUBEY, 1993). Os oocistos podem ser transportados mecanicamente por moscas, baratas, besouros, sendo uma forma de disseminação ambiental da parasitose (FREYRE; BANEGAS, 1989)

A infecção na população canina significa que a área envolvida representa um nicho ecológico para o desenvolvimento do parasito e, conseqüentemente, um risco para a população humana e outros animais susceptíveis (PAIVA et al., 2014). No cão, a infecção é de evolução crônica, assintomática na grande maioria dos casos, mas quando ocorrem condições imunossupressoras manifesta-se clinicamente como uma moléstia grave. O cão e todos os animais em que a toxoplasmose tem sido descrita, bem como o homem, são hospedeiros acidentais e intermediários, com exceção dos felinos (GERMANO et al., 1985).

Os alimentos vegetais contaminados com oocistos e os de origem animal crus ou mal cozidos, principalmente produtos suínos infectados com cistos, são os maiores responsáveis pela infecção humana, ou a ingestão de água contendo oocistos esporulados. No caso do cão, além destes alimentos, estão envolvidos, o solo contaminado, pelo hábito do cão se rolar na terra ou ingerir fezes de gatos contendo oocistos esporulados (xenosmofilia), faz com que contamine a si e o ambiente, e roedores infectados ingeridos parcial ou totalmente, como consequência do hábito de carnivorismo exercido por estes animais (GERMANO et al., 1985; LEAL; COELHO, 2014).

Em cada região a prevalência da toxoplasmose varia com a abundância de gatos e com os hábitos alimentares (REY, 2013). Levantamentos soroepidemiológicos, realizados em cães, evidenciam a elevada prevalência com que a infecção ocorre nesta população. Com a utilização da RIFI, Germano et al. (1985) detectaram uma positividade em 91% dos cães testados do município de Campinas/ SP, verificando que a positividade não teve correlação com o sexo e com a idade dos animais. Estes autores associam os resultados encontrados ao grande consumo de alimentos contaminados.

Em outro estudo realizado no município de Lavras/MG, 60,7% (132/218) dos cães testados foram positivos para *T. gondii*, contrariando o estudo anterior, houve uma maior soropositividade com o incremento da idade (GUIMARÃES et al., 2009), fato também observado por Guimarães et al. (1992) e Brito et al. (2002). Estes autores atribuíram estes resultados ao aumento da probabilidade de exposição ao *T. gondii* com o incremento da idade do animal. Quanto as variáveis sexo e raça, não houve diferença significativa. O fato de não ocorrer valores significativos quando se avalia o sexo, leva em conta o mecanismo de infecção fecal-oral, o qual ocorre pelo contato direto com o solo, alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, sendo que machos e fêmeas possuem as mesmas probabilidades de se infectarem.

Na avaliação das raças, a ocorrência está associada mais aos cuidados fornecido ao animal, a assistência veterinária e o restrito acesso à rua. Os animais de raça definida ou indefinida tem as mesmas possibilidades de infecção, desde que criados sob as mesmas condições, principalmente com acesso restrito à rua (ALI et al., 2003; CÂNON-FRANCO et al., 2004).

Em uma pesquisa nas cidades de Lages e Balneário Camboriú/SC, 22,3% (89/400) dos cães apresentaram soropositividade, e constataram através de inquérito epidemiológico, que houve uma maior ocorrência em cães sem raça definida, com acesso à rua e com dieta a base de comida caseira (MOURA et al., 2009). O livre acesso à rua representa fator de risco a ser considerado para a infecção por *T. gondii* (CAÑON-FRANCO et al., 2004).

Avaliando a ocorrência e os fatores de risco associados a toxoplasmose, Paiva et al. (2014), observaram uma soropositividade de 50% (74/158) em uma população canina de Jataí/GO. A soroprevalência foi influenciada pela idade e pela raça, entretanto sem predileção por sexo nem estação do ano. Os cães com idade acima de 97 meses foram tidos como mais predispostos à infecção, tornando-se dependente do tempo de exposição ao longo da vida (SANTOS, 2008; SILVA et al., 2009), bem como os cães sem raça definida. Estes cães

representaram maior porcentagem da população canina errante ou semi-domiciliada; portanto, com maiores probabilidades de terem contato com o agente, devido ao livre acesso à rua.

Quanto a estação do ano no momento da análise, Santos (2008) verificou que 63,51% (47/74) ocorreu no outono/inverno e 36,49% (27/74) na primavera/verão, o que não foi significativo estatisticamente, revelando que a sazonalidade não provoca interferência direta para ocorrência de soropositividade.

Em relação ao estudo sorológico, observa-se uma ampla variação nos índices de soropositividade, sendo 10,3% (6/58) em Botucatu/SP (GIRARDI et al., 2014); 51,1% (151/295) na região nordeste de São Paulo/SP (VARANDAS et al., 2001); 5,95% (5/84) em Andradina/SP (COELHO et al., 2013); 18% na cidade de Teresina/PI (95/530) (LOPES et al., 2011) e 58,7% em Majorca/Espanha (27/46) (CABEZÓN et al., 2010). Sendo de consenso geral entre vários autores, a prevalente disseminação do agente entre os cães, e o impacto da enfermidade na Saúde Pública, o cão pode ser utilizado como sentinela para a infecção humana.

Em geral, os animais não desenvolvem sinais clínicos de toxoplasmose, passando da primo-infecção para um estágio de infecção latente ou crônica. Em cães, a infecção fatal foi descrita pela primeira vez em 1910 na Itália. Em gatos foi relatada em 1942 nos EUA. Em ovinos constatou-se em 1957 na Nova Zelândia. Nos caprinos foi relatada em 1956 nos EUA. Em 1955 nos suínos nos EUA. Não há confirmação de caso clínicos em bovinos. Os sinais clínicos quando ocorrem, são muito variados, incluindo febre, discreta linfadenopatia, até casos mais graves com acometimento do sistema nervoso central, do sistema ocular ou abortos (MEGID, 2016).

No cão, geralmente, os sinais se manifestam após uma imunossupressão, fato que pode estar associado a coinfeção pelo vírus da cinomose ou a presença de *Erlichia canis*. Nestes casos podem desencadear várias alterações clínicas, tais como o comprometimento neuromuscular com ataxia, andar em círculos, alterações de comportamentos, convulsões, espasmos e tremores. É importante ressaltar o diagnóstico destes agentes em animais com sinais nervosos (AGUIAR et al., 2012; GIRARDI et al., 2014). Além disso, pode-se observar pneumonia, hepatite e encefalite.

Em ovinos é uma enfermidade reconhecida mundialmente como causa significativa de perdas fetais, sendo que aproximadamente 16% dos casos de abortamento nesta espécie estão relacionados com a infecção por este parasita. Nesta espécie, a idade gestacional que ocorre a infecção tem sido diretamente associada ao grau de lesão no feto. Se a infecção ocorrer no terço inicial da gestação, as perdas fetais são elevadas, enquanto que, no terço médio é

comum o nascimento de cordeiros fracos ou natimortos, ou mumificados. No terço final, o cordeiro nasce normal, porém infectado pelo parasita (MEGID, 2016).

Mulheres com infecção crônica por *T. gondii*, não contaminam seus filhos, durante o desenvolvimento intra-uterino. Todavia, mulheres que contraem a doença durante a gestação, estão sujeitas ao risco da transmissão da infecção ao feto com alta gravidade. O curso da doença depende dos anticorpos maternos para proteger o feto e da época gestacional em que a infecção ocorre. Até o sexto mês a manifestação clínica tende a ser aguda ou subaguda. Quando no último trimestre, tende a ser branda ou assintomática. Mais da metade dos filhos de mães que se infectaram durante a gravidez, nascem sem toxoplasmose. As lesões que prevalecem nos casos de infecções congênicas ocorrem no sistema nervoso e na retina e compreendem: retinocorioidite (90% dos pacientes), calcificações cerebrais (69%), perturbações neurológicas (60%) e hidrocefalo interno ou microcefalia (50%).

Contudo, existem formas graves e muitas vezes fatais, em adultos, com prostração, hepatite, esplenite, miocardite, meningite, encefalomielite. Também foi descrito uma pneumonia atípica por *T. gondii*. Nos países onde se consome carne mal cozida, a frequência de sorologia positiva é elevada, como na França (96%) e Alemanha (70%) (REY, 2013).

O diagnóstico da doença, exige um conjunto de informações e procedimentos, como: histórico, sinais clínicos, exames complementares e específicos através de pesquisa de anticorpos circulantes (VARANDAS et al., 2001; DUBEY; LAPPIN, 2006; ULLMANN et al., 2008).

Pacientes infectados podem ter fraca resposta específica frente aos antígenos de cistos teciduais, podendo-se utilizar então, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), exame histopatológico e imunohistoquímico que podem confirmar o diagnóstico (BRESCIANI et al., 2001; DUBEY, 2010; DUBEY; LAPPIN, 2006; FRESCHI et al., 2005). Também pode-se analisar amostras de biópsia de linfonodos, baço, fígado, músculo esquelético; líquidos biológicos e secreções; lavagem bronco-alveolar (DUBEY et al., 2007; DUBEY, 2010). A utilização da tomografia e ressonância computadorizada são adequadas, e não invasivas, para evidenciar lesões cerebrais e suas possíveis consequências (BERG; JOSEPH, 2003).

As prova sorológicas, que assinalam a reação antígeno-anticorpo, tem uma boa sensibilidade e especificidade. Diversas provas sorológicas têm sido preconizadas, dentre elas destaca-se: reação de Sabin-Feldman (SF), RIFI, método de aglutinação direta modificada (MAT), ELISA, reação de fixação de complemento (FC) e reação de hemaglutinação indireta ou passiva (HI) (MEGID, 2016). Dentre as técnicas de diagnóstico existentes, a RIFI é preconizada como padrão ouro, podendo ser usada tanto na fase aguda (pesquisa de IgM)

quanto na fase crônica (pesquisa de IgG) (CAMARGO, 1974; DUBEY et al., 1988; DUBEY, 2010).

No tratamento, os antimicrobianos mais utilizados são as sulfonamidas, com predomínio da sulfadiazina associada ou não à pirimetamina, ou a clindamicina. Ao se utilizar a pirimetamina, o ácido folínico pode ser associado para prevenir efeitos colaterais (1mg/kg, a cada 24h na ração), ou o ácido fólico (5mg/kg a cada 24h), no período de tratamento (MEGID, 2016). O tratamento pode ser comprometido devido a sensibilidade, a distribuição do fármaco, local da infecção e as condições dos tecidos circundantes à infecção (MADDISON, 2009).

A prevenção é a maneira mais eficiente de controle da toxoplasmose. Desta forma preconiza-se evitar o contato de fezes de gatos com alimentos e água, não ingerir carne crua ou mal cozida, ferver o leite, não consumir ovos crus. Realizar controle de vetores mecânicos como moscas e baratas. Fato importante a ser ressaltado é que o problema não é o contato direto dos oocistos com as mãos, mas o descuido de levar a mão contaminada aos olhos e a boca. A prevenção é extremamente importante em gestantes soronegativas e em pacientes imunocomprometidos.

Os cistos nos alimentos podem ser destruídos pelo cozimento a 66°C, pela defumação e cura, ou pelo congelamento a menos 20°C por 24 horas. Os animais devem ser alimentados com carne cozida ou ração, impedidos de realizar coprofagia e o controle da natalidade principalmente no caso de cães errantes pode contribuir para a redução da ocorrência desta importante zoonose (JITTAPALONG et al., 2007; MEGID, 2016).

A toxoplasmose não é uma doença de notificação compulsória, com exceção de surtos, como ocorreu em Santa Isabel do Ivaí/PR, reconhecido como o maior surto de toxoplasmose por veiculação hídrica do mundo, onde 600 pessoas procuraram os postos de saúde, com sinais clínicos compatíveis. Destes, 426 apresentaram sorologia sugestiva de infecção aguda, dos quais 7 eram gestantes, 6 tiveram filhos infectados e, uma apresentou anomalia congênita grave e outra abortou espontaneamente (MEGID, 2016).

### 3 MANUSCRITO

**Manuscrito será submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ISSN 0102-0935)**

**Coinfecções por *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães necropsiados da região central do Rio Grande do Sul, Brasil**

[Coinfections by *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in necropsied dogs from the central region of Rio Grande do Sul, Brazil]

F. R. Ratzlaff<sup>1</sup>, A. M. Engelmann<sup>1</sup>, F. S. Luz<sup>1</sup>, P. Bräunig<sup>1</sup>, C. M. Andrade<sup>1</sup>, R. A. Fighera<sup>1</sup>, S. A. Botton<sup>1</sup>, F. S. F. Vogel<sup>1</sup>, L. Potter<sup>1</sup>, L. A. Sangioni<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria - Av. Roraima, 1000

97105-900 – Santa Maria, RS \* Autor para correspondência: lasangioni@gmail.com

#### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a presença de anticorpos para *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em cães (n=78) provenientes da região central do Rio Grande do Sul, necropsiados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), bem como avaliar os dados epidemiológicos, sazonais e anatomo-histopatológicos. Do total de animais avaliados, 67,9% (53/78) apresentaram soropositividade para ao menos um agente. A ocorrência de anticorpos para *L. infantum*, *N. caninum* e *T. gondii* foi de 33,3 (26/78), 37,1 (29/78) e 43,5% (34/78) respectivamente. Detectou-se monoinfecções em 9,4% (5/53) para *L. infantum*, 18,8% (10/53) para *N. caninum* e 20,7% (11/53) para *T. gondii*. As coinfecções foram observadas em 27/53 (50,9%) dos animais. As infecções ocorreram independentes de idade, sexo, procedência ou raça (P>0,05). Não verificou-se lesões anatomo-histopatológicas relacionadas aos agentes pesquisados, caracterizando-os como animais subclínicos. Os resultados confirmaram a exposição de cães a estes protozoários na região central do RS e, em especial, demonstrou a circulação do agente causador da leishmaniose em uma área considerada indene para a enfermidade.

**Palavras-chave:** protozooses, anticorpos, sorologia, achados patológicos, Imunofluorescência Indireta.

## ABSTRACT

The present paper is aimed to determine the presence of antibodies for *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by indirect immunofluorescence (IIF) in dogs (n=78) from the central region in the state of Rio Grande do Sul necropsied in the Veterinary Hospital from Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The data was epidemiological evaluate and also anatomical and histopathological findings. Of the total animals evaluated, 67.9% (53/78) showed seropositivity for at least one agent. The occurrence of antibodies to *L. infantum*, *N. caninum* and *T. gondii* was 33.3% (26/78) 37.1% (29/78) and 43.5% (34/78), respectively. The mono infections were detected in 9.4% (5/53) of *L. infantum*, 18.8% (10/53) for *N. caninum* and 20.7% (11/53) *T. gondii*. The coinfections occurred in 50.9% (27/53) of animals. There were not anatomical and histopathological lesions regarding these surveyed agentes, characterize them as subclinical animals. The results confirmed the exposition of dogs to these protozoa in the central region of the RS, in particular, they demonstrated the circulation of the causer agent of leishmaniasis in an area considered harmless for the disease. **Keywords:** protozoa, antibodies, serology, pathologic findings, indirect immunofluorescence.

## INTRODUÇÃO

O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) pode ser infectado por uma grande variedade de protozoários. Algumas espécies desses parasitos podem apresentar potencial zoonótico e letal para animais e humanos. O estudo desses agentes apresenta grande relevância epidemiológica devido à crescente relação entre o homem e os animais de estimação, implicando em maiores cuidados sanitários, a fim de evitar a transmissão zoonótica (Coelho *et al.*, 2013). *Leishmania infantum*, responsável pela leishmaniose visceral (LV) em humanos e animais, tem o cão como principal reservatório em áreas urbanas e o mosquito *Lutzomyia longipalpis* como vetor (Hirschmann *et al.*, 2015). No Brasil, a leishmaniose é considerada uma zoonose emergente, apresentando ampla distribuição geográfica (Gontijo e Melo, 2004). O Rio Grande do Sul era considerado uma área indene desta enfermidade até o ano de 2008, quando houveram os primeiros casos autóctones em cães provenientes do município de São Borja. No ano de 2009, foi verificada a ocorrência de casos em seres humanos (Rio Grande do Sul, 2011).

*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* são protozoários intracelulares que apresentam ampla distribuição geográfica e podem causar doença neurológica, gastrointestinal, respiratória e muscular em cães (Gennari *et al.*, 2002). *N. caninum* é um importante agente patogênico para os bovinos e os cães (Dubey, 2003). Os canídeos, são considerados os hospedeiros definitivos do agente, eliminando oocistos nas fezes (Dubey e Lindsay, 1996). Em bovinos, a

neosporose pode causar abortos, acarretando grandes perdas econômicas na produção animal (Boaventura *et al.*, 2008). A soroprevalência de *N. caninum* em cães é influenciada por vários fatores, entre os quais: o habitat, a idade, a raça, o convívio dos cães com bovinos e a técnica sorológica empregada no diagnóstico (Cañón-Franco *et al.*, 2003).

*T. gondii* é um protozoário que acomete praticamente todas as espécies animais (Dubey e Beattie, 1988) e tem os felídeos (domésticos e selvagens) como hospedeiros definitivos. Os cães, assim como os seres humanos, são hospedeiros intermediários deste parasito (Leal e Coelho, 2014; Rey, 2013). Geralmente, a toxoplasmose ocorre de forma assintomática, em decorrência da competência imunológica do hospedeiro (Germano *et al.*, 1985). Apesar de não atuarem como hospedeiros definitivos, os cães tem envolvimento na transmissão e manutenção deste agente. Os cães domésticos assumem uma importante função na epidemiologia desta protozoose, como animais sentinelas da contaminação humana e ambiental por estarem inseridos na família como mascotes e animais de companhia (Ullmann *et al.*, 2008; Leal e Coelho, 2014). Além disso, pelo hábito da xenosmofilia, os cães podem carrear oocistos esporulados nos pêlos, podendo desta forma, servir de fonte de infecção para humanos (Leal e Coelho, 2014). Portanto, a soropositividade para *T. gondii* na população canina é um indicativo do risco de exposição para humanos e outros animais suscetíveis (Germano *et al.*, 1985; Paiva *et al.*, 2014). Coinfecções parasitárias podem ocasionar agravos clínicos em animais, principalmente em áreas endêmicas para leishmaniose (Sousa e Almeida, 2008).

Considerando-se a importância desses patógenos para os cães, o presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de anticorpos contra *L. infantum*, *N. caninum* e *T. gondii* e verificar a coinfecção destes agentes, relacionando com fatores epidemiológicos. Adicionalmente, buscou-se verificar a presença da infecção por *L. infantum*, em uma área considerada indene no RS e correlacionar sua possível presença com os achados anatomo-histopatológicos obtidos na rotina do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os cães selecionados para este estudo foram oriundos da rotina de exames anatomo-histopatológicos do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da UFSM, no período de novembro de 2014 a abril de 2016, onde foram necropsiados 201 animais. Deste total, em 159 foi realizada prévia coleta de sangue para a realização de exames complementares durante a consulta clínica, sendo que 78 amostras permaneceram disponíveis e armazenadas a -20°C no

banco de soro do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVET) da UFSM. Os cães eram procedentes de Agudo, Jaguari, Júlio de Castilhos, Mata, Santa Maria, Santiago, São Martinho da Serra, São Vicente do Sul e Tupanciretã, municípios da região central do RS, considerados indenes para leishmaniose. Os animais foram atendidos no Hospital Universitário Veterinário (HUV), pelo setor de Clínica de Pequenos Animais da UFSM e encaminhados para necropsia, em decorrência de morte natural ou eutanásia.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi a técnica empregada para identificação dos animais sororreagentes para *L. infantum*, *N. caninum* e *T. gondii*. Para a detecção de anticorpos anti-*L. infantum*, utilizou-se o kit de diagnóstico comercial (Imunoteste leishmania (RIFI)<sup>®</sup>, produzido por Imunodot Diagnósticos Ltda<sup>®</sup>-Jaboticabal/SP - Brasil), que continha o substrato antigênico deste agente. O ponto de corte de positividade foi considerado a diluição dos soros de 1:40 conforme orientações do fabricante. Para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* foram utilizados como antígenos os taquizoítos de *N. caninum* (NC-1) e *T. gondii* (cepa RH) e adotando-se o ponto de corte de positividade a diluição de 1:50 e 1:16, respectivamente (Varandas *et al.* 2001). Na execução do teste utilizou-se o conjugado, anticorpo anti-IgG de cão, produzido em coelhos, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC – Sigma F-7884, São Paulo - Brasil), na diluição de 1:100. Os controles positivos e negativos foram utilizados em todas as lâminas e foram consideradas reações positivas quando houve a fluorescência total da superfície dos protozoários pesquisados. A leitura dos testes foi executada em microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x. Para a titulação das amostras positivas, foram realizadas diluições em dobro dos respectivos soros, sendo considerada como título final a maior diluição que mostrou fluorescência completa das promastigotas para leishmaniose e de taquizoítos para neosporose e toxoplasmose (Greca *et al.*, 2010).

Para a análise da correlação da presença de anticorpos anti- *L. infantum*, anti- *N. caninum* e anti-*T. gondii* e os achados anatomo-histopatológicos foram utilizadas as informações dos laudos disponibilizados pelo LPV, independentemente da *causa mortis* dos cães. As informações epidemiológicas como: raça, sexo, idade, procedência e data de realização dos procedimentos clínico-laboratoriais foram coletadas dos prontuários de atendimento. Foi aplicado o teste do Qui-quadrado aos resultados obtidos, com um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ), para verificar a associação entre a positividade das diferentes protozooses e respectivas coinfeções, as variáveis epidemiológicas e sazonalidade dos diagnósticos.

O referido trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) sob o número de protocolo 1332120515.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 78 amostras de soro canino analisadas através da RIFI, 53 (67,9%) apresentaram positividade para um ou mais protozoários, sendo: 26 (33,3%) anti-*L. infantum*, 29 (37,1%) anti-*N. caninum* e 34 (43,5%) anti-*T. gondii*. As monoinfecções foram detectadas em 5/53 (9,4%), 10/53 (18,8%) e 11/53 (20,7%) dos cães para *L. infantum*, *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente. As coinfeções foram observadas em 27/53 (50,9%) dos animais, distribuídas conforme Fig. 1. As titulações máximas dos soros variaram de 1:40 a 1:5120 para *L. infantum*, 1:100 a 1:25.000 para *N. caninum* e 1:16 a 1:512 para *T. gondii*, como demonstrado na Tab. 1.

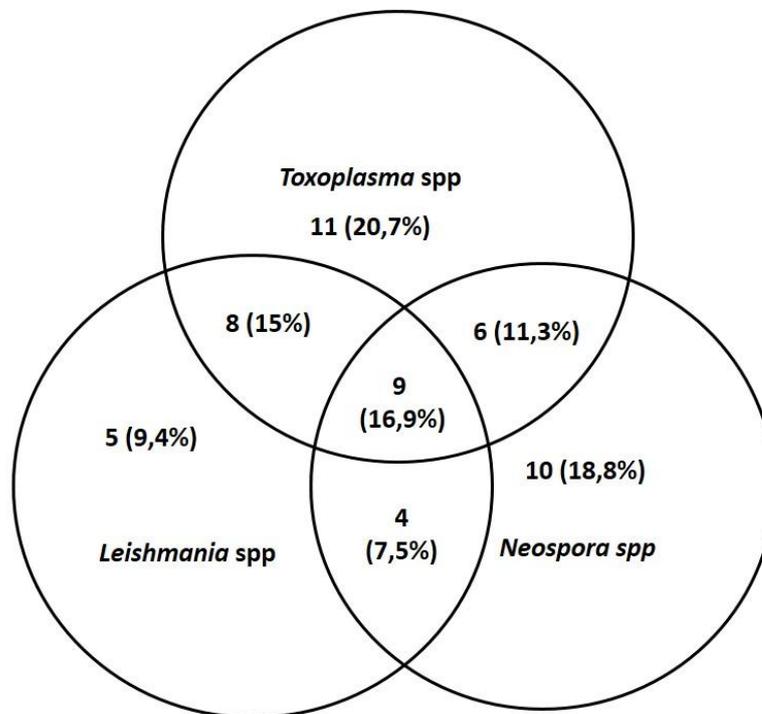


Figura 1. Distribuição dos cães soropositivos em mono ou coinfeções de acordo com o agente pesquisado *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, no período de novembro de 2014 a abril de 2016.

Tabela 1. Títulos máximos de anticorpos para *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em soro de cães necropsiados no Laboratório de Patologia da UFSM, no período de novembro de 2014 a abril de 2016.

<i>Leishmania infantum</i>									
T M	n	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
Positivos (%)	26	3 (11,5)	11 (42,3)	7 (26,9)	1 (03,8)	2 (07,6)	1 (03,8)	0 (00,0)	1 (03,8)
<i>Neospora caninum</i>									
T M		1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:25000
Positivos (%)	29	0 (00,0)	8 (27,5)	6 (20,6)	5 (17,2)	4 (13,7)	2 (06,8)	3 (10,3)	1 (03,4)
<i>Toxoplasma gondii</i>									
T M		1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Positivos (%)	34	2 (05,8)	5 (14,7)	10 (29,4)	11 (32,3)	3 (08,8)	3 (08,8)	0 (00,0)	0 (00,0)

n= número de animais soropositivos; T M = título máximo

A distribuição da soroprevalência para os protozoários, conforme os dados epidemiológicos analisados (idade, sexo, procedência, raça e data de realização dos procedimentos clínico-laboratoriais, correspondendo a estação do ano), estão representados na Tab. 2.

Tabela 2. Distribuição de cães positivos para *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, de acordo com a idade, sexo, procedência, raça e período de realização dos procedimentos clínico-laboratoriais (estação do ano).

Variáveis	n	Positivos (%)						
		L <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	L <sup>1</sup> +N <sup>2</sup>	L <sup>1</sup> +T <sup>3</sup>	N <sup>2</sup> +T <sup>3</sup>	L <sup>1</sup> +N <sup>2</sup> +T <sup>3</sup>
<b>Idade (anos)</b>								
< 1	00	0 <sup>a</sup> (00,0)	0 <sup>a</sup> (00,0)	0 <sup>a</sup> (00,0)	0 <sup>a</sup> (00,0)	0 <sup>a</sup> (00,0)	0 <sup>a</sup> (00,0)	0 <sup>a</sup> (00,0)
1 a 7	18	3 <sup>a</sup> (16,6)	5 <sup>a</sup> (27,7)	1 <sup>a</sup> (05,5)	1 <sup>a</sup> (05,5)	4 <sup>a</sup> (22,2)	1 <sup>a</sup> (05,5)	3 <sup>a</sup> (16,6)
8 a 17	35	2 <sup>a</sup> (05,7)	5 <sup>a</sup> (14,2)	10 <sup>a</sup> (28,5)	3 <sup>a</sup> (08,5)	4 <sup>a</sup> (11,4)	5 <sup>a</sup> (14,2)	6 <sup>a</sup> (17,1)
P*		0,2124	0,9306	0,1270	0,6966	0,3032	0,3467	0,9655
<b>Sexo</b>								
Macho	25	2 <sup>a</sup> (08,0)	5 <sup>a</sup> (20,0)	4 <sup>a</sup> (16,0)	2 <sup>a</sup> (08,0)	6 <sup>a</sup> (24,0)	3 <sup>a</sup> (12,0)	3 <sup>a</sup> (12,0)
Fêmea	28	3 <sup>a</sup> (10,7)	5 <sup>a</sup> (17,8)	7 <sup>a</sup> (25,0)	2 <sup>a</sup> (07,1)	2 <sup>a</sup> (07,1)	3 <sup>a</sup> (10,7)	6 <sup>a</sup> (21,4)
P*		0,6883	0,7100	0,9829	0,9070	0,0901	0,8839	0,3660
<b>Procedência</b>								
Santa Maria	42	4 <sup>a</sup> (09,5)	8 <sup>a</sup> (19,0)	9 <sup>a</sup> (21,4)	3 <sup>a</sup> (07,1)	7 <sup>a</sup> (16,6)	5 <sup>a</sup> (11,9)	6 <sup>a</sup> (14,2)
Outras	11	1 <sup>a</sup> (09,0)	2 <sup>a</sup> (18,1)	2 <sup>a</sup> (18,1)	1 <sup>a</sup> (09,0)	1 <sup>a</sup> (09,0)	1 <sup>a</sup> (09,0)	3 <sup>a</sup> (27,2)
P*		0,6853	0,5084	0,9684	0,8292	0,5360	0,7951	0,3118
<b>Raça</b>								
Definida	27	2 <sup>a</sup> (07,4)	7 <sup>a</sup> (25,9)	8 <sup>a</sup> (29,6)	3 <sup>a</sup> (11,1)	2 <sup>a</sup> (07,4)	2 <sup>a</sup> (07,4)	3 <sup>a</sup> (11,1)
Não definida	26	3 <sup>a</sup> (11,5)	3 <sup>a</sup> (11,5)	3 <sup>a</sup> (11,5)	1 <sup>a</sup> (03,8)	6 <sup>a</sup> (23,0)	4 <sup>a</sup> (15,3)	6 <sup>a</sup> (23,0)
P*		0,0773	0,9015	0,1878	0,3215	0,1146	0,3641	0,2406
<b>Estações</b>								
Inverno	07	2 <sup>b</sup> (28,5)	0 <sup>a</sup> (00,0)	1 <sup>a</sup> (14,2)	0 <sup>a</sup> (00,0)	2 <sup>a</sup> (28,5)	0 <sup>a</sup> (00,0)	2 <sup>a</sup> (28,5)
Primavera	17	1 <sup>a</sup> (05,8)	2 <sup>a</sup> (11,7)	3 <sup>a</sup> (17,6)	2 <sup>a</sup> (11,7)	5 <sup>a</sup> (29,4)	1 <sup>a</sup> (05,8)	3 <sup>a</sup> (17,6)
Verão	16	1 <sup>a</sup> (06,2)	6 <sup>a</sup> (37,5)	5 <sup>a</sup> (31,2)	1 <sup>a</sup> (06,2)	0 (00,0)	1 <sup>a</sup> (06,2)	2 <sup>a</sup> (12,5)
Outono	13	1 <sup>a</sup> (07,6)	2 <sup>a</sup> (15,3)	2 <sup>a</sup> (15,3)	1 <sup>a</sup> (07,6)	1 <sup>a</sup> (07,6)	4 <sup>a</sup> (30,7)	2 <sup>a</sup> (15,3)
P*		0,0230	0,2888	0,5789	0,7954	0,0726	0,0867	0,8239

n = número total de amostras, <sup>1</sup> *Leishmania infantum*, <sup>2</sup> *Neospora caninum*, <sup>3</sup> *Toxoplasma gondii*. P\*: Qui-quadrado. Valores significativos P<0,05. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si (P ≥ 0,05)

Neste estudo foi evidenciado que 26/78 (33,3%) dos cães apresentaram anticorpos anti-*L. infantum*, sendo provenientes dos seguintes municípios: 20 (20/26) cães procedentes de Santa Maria, um (1/26) do município de Mata, dois (2/26) de Santiago, um (1/26) de São Martinho da Serra, um (1/26) de São Vicente do Sul e um (1/26) de Tupanciretã. Esses municípios são considerados áreas indenes para leishmaniose. Dessa forma, os achados deste estudo elevam o número de municípios do RS considerados como áreas de risco para esta doença.

Marcondes *et al.* (2003) realizaram um levantamento sorológico para a presença de *L. infantum* em 203 cães, sendo 40 animais provenientes de Santa Maria/RS, não sendo constatado resultados positivos, bem como não foi identificado o vetor flebotômico na região. O Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN/RS), no período de 2009 a 2010, analisou 5.430 amostras sorológicas caninas e obteve 20,8% (112/5.430) de sororreagentes. Estes animais eram provenientes de 34 municípios do estado. Porém, o estudo não abrangeu o município de Santa Maria, por não ser considerada área de risco (Rio Grande do Sul, 2011). Em 2015, Mazaro *et al.* (2015), descreveram três casos clínicos caninos autóctones em Santa Maria/RS no ano de 2013. Os animais apresentaram manifestações clínicas, diagnóstico laboratorial e anatomopatológico compatíveis com leishmaniose visceral. Este fato, aliado aos achados do presente estudo, ressalta a emergência desse problema para os serviços de Saúde Pública da região, bem como configura uma franca expansão geográfica do agente no RS e no Brasil. Dessa forma, constata-se a disseminação do patógeno entre os cães na região central do RS. Adicionalmente, Hirschmann *et al.* (2015) encontraram uma soropositividade através da RIFI de 33,9% (56/165) de cães assintomáticos provenientes de 4 municípios, de um total de 12 pesquisados, sem diagnósticos prévios de leishmaniose visceral canina (LVC), da região sul do RS. Esses resultados comprovam que a leishmaniose já está disseminada na população canina do RS e na grande maioria em cães assintomáticos. Com isso, cães infectados pelo protozoário no RS estão aptos para atuar como fonte de infecção para flebotômicos (Rio Grande do Sul, 2011).

Neste trabalho anticorpos anti- *N. caninum* foram detectados em 37,1% (29/78) das amostras de soros caninos avaliadas. Cunha Filho *et al.* (2008), detectaram uma soropositividade de 5,5% (6/109) nos cães urbanos e 20,4% (47/230) nos animais de áreas rurais de Pelotas/RS, constatando que cães de áreas rurais têm maior risco de contato quando comparados aos cães urbanos. Contudo, Boaventura *et al.* (2008), em Goiânia/GO, descreveram resultados semelhantes ao presente estudo, onde obtiveram 32,9% (65/197) de cães positivos na RIFI, ao avaliarem amostras provenientes de cães urbanos, onde obtiveram 36,1% (26/72)

provenientes do Centro de Zoonoses e 31,2% (39/125) de cães domiciliados atendidos por hospitais veterinários.

A infecção pelo protozoário *N. caninum* pode apresentar a forma assintomática ou desencadear sinais clínicos que podem ser facilmente confundidos com outras doenças, especialmente outras afecções neurológicas, dificultando o diagnóstico clínico e ressaltando a importância da confirmação laboratorial (Dantas *et al.*, 2013). Tanto as infecções clínicas como as subclínicas por *N. caninum* em cães são importantes epidemiologicamente, por ser o cão o principal hospedeiro capaz de eliminar oocistos no ambiente representando fator de risco para a ocorrência de abortos em bovinos (Boaventura *et al.* 2008) e a transmissão horizontal para outros hospedeiros.

A ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii* foi de 43,5% (34/78), com a titulação variando de 1:16 a 1:512, indicando a exposição ao agente. Giraldi *et al.* (2002) encontraram títulos de 1:4096 em animais que apresentavam distúrbios neurológicos, o que pode estar relacionado a infecção aguda. Germano *et al.* (1985) verificaram uma prevalência de 91% de *T. gondii* em cães oriundos de Campinas/SP, podendo este alto índice estar associado ao baixo consumo de ração pelos cães ou menor uso de vacina contra cinomose. Este vírus apresenta um caráter imunossupressor aumentando as chances de infecção pelo protozoário (Giraldi *et al.*, 2002). Os cães são considerados animais sentinelas para a ocorrência de *T. gondii* no meio ambiente (Ullmann *et al.*, 2008), podendo adquirir a infecção pelo hábito alimentar ou pelo estreito contato com o solo contaminado (Langoni *et al.*, 2006). A soroprevalência evidenciada nesta pesquisa expressa a possibilidade de risco de infecção por *T. gondii* para os humanos, sendo que os cães podem compartilhar fontes similares de infecção no mesmo ambiente (Marques *et al.*, 2009).

As coinfeções representaram a maioria neste estudo (50,9%; 27/53). Porém, a presença de um agente não favoreceu a infecção por outro ( $P > 0,05$ ). Greca *et al.*, 2010 também não observaram associação entre *L. infantum* e *N. caninum* em Bauru/SP. Os cães tiveram as mesmas chances de se infectarem para um ou mais agentes. O mesmo foi verificado no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí por Lopes *et al.* (2011). Por outro lado, no sul da Itália, demonstrou-se que a presença de soropositividade para *N. caninum* foi o principal fator de risco para soropositividade para *L. infantum* e vice-versa em uma área endêmica para leishmaniose visceral, em cães assintomáticos. Esses autores afirmaram que, na região estudada, a coinfeção é muito comum em cães e a infecção por um protozoário pode aumentar a suscetibilidade para o outro, provavelmente pelo estado imunológico dos cães avaliados. Os autores também evidenciaram que títulos significativamente maiores para

*L. infantum* ocorreram em cães coinfectados (Cringoli *et al.*, 2002). Nesse estudo, os animais que apresentaram as maiores titulações para *L. infantum* apresentaram coinfeções com *N. caninum* e *T. gondii*.

Outros autores buscaram avaliar as coinfeções de *L. infantum*, *N. caninum* ou *T. gondii* com outros agentes como: *Ehrlichia canis* (Girardi *et al.*, 2014; Sousa e Almeida, 2008), *Babesia* spp (Guimarães *et al.*, 2009) e o vírus da cinomose (Aguiar *et al.*, 2012). O vírus da cinomose, desencadeia imunossupressão, tornando o animal mais suscetível ao desenvolvimento de infecções secundárias por *N. caninum* ou *T. gondii*, considerados protozoários oportunistas (Aguiar *et al.*, 2012). A ocorrência de coinfeções pode contribuir para a manifestação clínica de alguma das protozooses, em virtude do caráter oportunista dos agentes parasitários, em relação ao estabelecimento da doença (Girardi *et al.*, 2014). No entanto, não foi constatada esta relação no presente estudo.

A presença de anticorpos contra os agentes pesquisados ocorreu em animais de diferentes idades, sem predominância de sexo ou raça, provenientes de Santa Maria e outras cidades da região central do estado do RS ( $P > 0,05$ ). A maior ocorrência dos diagnósticos de *L. infantum* foi observada no período da realização dos procedimentos clínico-laboratoriais (estação do ano) nos meses de inverno ( $P = 0,02$ ). Uma possível justificativa para esta ocorrência sazonal, poderia estar relacionada as dinâmicas das populações dos vetores. Comumente, a densidade dos flebotomíneos oscila pouco, em locais de clima quente e úmido. Porém, no RS há características climáticas demarcadas por mudanças de temperaturas e distribuição desigual das chuvas, ocasionando a oscilação na densidade de insetos, declinando principalmente nos meses frios (Rey, 2013). Desta forma, pode-se sugerir que a população de vetores, foi maior nos meses de outono, época de temperaturas amenas e com alta umidade na região de Santa Maria/RS, aumentando as chances de infecção da população canina e o surgimento da soropositividade nos meses subsequentes na estação do inverno. Todavia, salienta-se que este fator foi relacionado ao período do diagnóstico clínico-laboratorial, podendo ocorrer a infecção em qualquer estação do ano.

Varandas *et al.* (2001) e Guimarães *et al.* (2009) obtiveram resultados semelhantes a este trabalho, em relação a variável sexo, em um levantamento sorológico para *N. caninum* e *T. gondii*, na região nordeste do estado de São Paulo, e no município de Lavras/MG respectivamente. Nesse estudo, machos e fêmeas da espécie canina estiveram submetidas as mesmas condições de risco. Tais resultados também estão em conformidade com Boaventura *et al.* (2008), que não constataram diferença significativa para as variáveis sexo e procedência com relação ao *N. caninum* em Goiânia. Aguiar *et al.* (2012) também não acharam

associações significativas em cães de Botucatu/SP, quando avaliaram cães com o vírus da cinomose e infecções oportunistas por *N. caninum* e *T. gondii*, onde nenhuma associação foi detectada entre a idade, o sexo, a raça e os sinais clínicos. Sousa e Almeida (2008), afirmaram não ter encontrado predisposição sexual e racial para *L. infantum*, em Cuiabá/MT. Cringoli *et al.* (2002) no entanto, obtiveram uma associação entre a raça Boxer e a presença de anticorpos para *N. caninum*. Dubey e Lindsay (1996) verificaram uma correlação entre cães da raça Setter e Pit bulls com a infecção por *L. infantum*. Todavia, neste estudo não foi observada correlação entre animais de raça definida e indefinida e a soropositividade para os protozoários pesquisados, provavelmente pelos cães serem domiciliados. Estes animais são tratados da mesma forma e possuem as mesmas chances de se infectarem, sendo de raça definida ou não.

No presente estudo, não houve significância com relação a idade para nenhum dos agentes, o que indica que os animais são expostos aos protozoários ainda muito jovens. Em relação a *T. gondii*, Guimarães *et al.* (2009) verificaram que houve um número maior de sororreagentes com o incremento da idade, atribuindo-se a esta diferença, ao aumento da chance de exposição ao parasita com o passar do tempo.

Os achados anatomo-histopatológicos demonstraram que dentre as principais *causa mortis* foram relatadas: diabete melito descompensada, epilepsia idiopática, tumores, cirrose, intoxicação por diaceturato de diminazeno, septicemia, pancreatite aguda, insuficiência renal aguda e crônica, insuficiência cardíaca congestiva, miocardiopatia hipertrófica, trauma, cinomose, crise hemolítica crônica, leptospirose, entre outras. Não se observaram lesões características que pudessem ser atribuídas a algum dos três protozoários estudados, sem distinção entre os cães sorologicamente positivos e negativos. Interessantemente, dois cães apresentaram reação linfoplasmocitária decorrente de infecção por *Leishmania* spp. e, ainda assim, permaneceram assintomáticos, o que agrava a situação na região onde os cães se mantêm como reservatórios do protozoário.

## CONCLUSÕES

A detecção de anticorpos verificada neste estudo, contribui para o conhecimento da epidemiologia da leishmaniose, neosporose e toxoplasmose canina na região central do RS. A realização do inquérito sorológico, associado aos achados histopatológicos permitiu concluir que os animais foram infectados e mantiveram-se assintomáticos. A infecção ocorreu sem predomínio de raça, idade e sexo. Desta forma, confirmou a endemicidade destes agentes e caracterizou o cão como animal sentinela para estas infecções. Tal fato é de grande

relevância, principalmente em casos de agentes zoonóticos, uma vez que os animais deste estudo não eram errantes, os quais dividiam o mesmo ambiente com os humanos, que estão expostos aos mesmos riscos. Além disso, a constatação de cães assintomáticos sorologicamente positivos para *L. infantum* desempenhando o papel de multiplicador do agente, em seis municípios do RS, considerados áreas indenes, é um dado relevante. Esta constatação poderá contribuir com os serviços de Saúde Pública para elaborar medidas profiláticas, com o intuito de prevenir casos autóctones e na elaboração de estratégias de controle e profilaxia, para se diminuir o risco de infecções por estas protozooses em cães e humanos.

### REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; AMUDE, A. M.; SANTOS, L. G. F. et al. Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.1, p./221-224, 2012.
- BOAVENTURA, C.M.; OLIVEIRA, V.S.F.; MELO, D.P.G. et al. Prevalência de *Neospora caninum* em cães de Goiânia. *Rev. Patol. Trop.*, v. 37, n.1, p.15-22, 2007.
- Cañón-Franco, W.A.; Bergamaschi, D.P.; Labruna, M.B. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. *Vet. Parasitol.*, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.
- COELHO, W. M. D., COELHO, A., DE CARVALHO, J. et al. Detecção de co-infecções por *Leishmania (L.) chagasi*, *Trypanosoma evansi*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães. *Ars Veterinaria*, v.29, n.3, p.169-174, 2013.
- CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F. et al. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 106, n.4, p. 307-313, 2002.
- CUNHA FILHO, N.A.; LUCAS, A.S.; PAPPEN, F.G. et al. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.17, supl. 1, p. 301-306, 2008.
- DANTAS, S.B.A.; FERNANDES, A.R.F.; NETO, O.L.S. et al. 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. *Ciênc. Rural*, v. 43, n. 11, p. 2042-2048, 2013.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC, 1988.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, v. 67, p.1-59, 1996.

- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- GENNARI, S.M.; YAI, L.E.O.; D'ÁURIA, S.N.R. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.106, p 177–179, 2002.
- GERMANO, P.M.L.; ERBOLATO, E.B.; ISHIZUKA, M.M. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas, 1981. *Rev. Fac. Med. Vet. e Zootec. Univ. S. Paulo*, v. 22, n. 1, p. 53-58, 1985.
- GIRALDI, J. H.; BRACARENSE, F.R.L.; VIDOTTO, O. et al. Sorologia e histopatologia de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. *Sem.: Ciênc. Agr.*, v.23, n.1, p. 9-14, 2002.
- GIRARDI, A. F.; LIMA, S. R.; MELO, A. L. T. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e *Ehrlichia canis* em cães com alterações nervosas atendidos em hospital veterinário universitário. *Sem.: Ciênc. Agr.*, v.35, n.4, p.1913-1922, 2014.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, n.3, p.338-348, 2004.
- 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.1, p. 224-227, 2010.
- GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.18, supl.1, p. 49-53, 2009.
- HIRSCHMANN, L. C.; BROD, C. S.; RADIN, J. et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. *Ver. Pat. Trop.*, v. 44, n.1, p. 33-44, 2015.
- LANGONI, H.; MODOLO, J.R.; PEZERICO, S. B. et al. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, SP, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v. 12, n. 1, p. 142-148, 2006.
- LEAL, P.D.S.; COELHO, C.D. Toxoplasmose em cães: uma breve revisão. *Coccidia*, v.2, n.1, p.2-39, 2014.
- LOPES, M. G.; MENDONÇA, I.L.; FORTES, K.P. et al. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. *Ver. Bras. Parasit. Vet.*, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011.

- MARCONDES, C. B.; PIRMEZ, C.; SILVA, E. S. et al. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, v. 36, n.4, 499-501, 2003.
- MARQUES, J. M.; ISBRECHT, F. B.; LUCAS, T. M. et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Sem.: Ciênc. Agr.*, v. 30, n.4, p. 889-898, 2009.
- MAZARO, R.D.; PEREIRA, P.R.; BIANCHI, R.M. et al. Identificação de casos autóctones de leishmaniose em cães da Região Central do RS atendidos no HVU-UFSM (2010-2014). In 67<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2015, São Carlos. *Anais...*São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2015. 1 CD.
- PAIVA, J.B.; SANTOS, E.A.; PINTO, J.F.N. et al. Avaliação da ocorrência, fatores de risco e associações laboratoriais hematológicas para Toxoplasmose em cães na região de Jataí- GO, Brasil. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, v.10, n. 18, p.502-509, 2014.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, p. 724.
- RIO GRANDE DO SUL, Ministério da Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVES). *Bol. Epidem.*, v.13, n.1, p. 1-8, 2011. Disponível em: <[http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106\\_v.13,%20n.1,%20mar.,%202011.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106_v.13,%20n.1,%20mar.,%202011.pdf)> Acessado em: 28 mai. 2016.
- SOUSA V.R.F.; ALMEIDA A.B.P.F. Coinfecção entre leishmaniose visceral e ehrlichiose monocítica em cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Acta Sci.Vet.* v. 36, n.2, p.113-117, 2008.
- ULLMANN, L.S.; GUIMARÃES, F.F; FORNAZARI, F. et al. Ações de vigilância continuada, papel do cão como animal sentinela para toxoplasmose. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17 Supl 1, p. 345-347, 2008.
- VARANDAS, N.P.; RACHED, P.A.; COSTA, G.H.N. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do Estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. *Sem.: Ciênc. Agr.*, v. 22, n.1, p. 105-111, 2001.

## 4 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou determinar a presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soro canino, provenientes de animais atendidos no Hospital Veterinário da UFSM e necropsiados no Laboratório de Patologia no período de novembro de 2014 a abril de 2016, domiciliados na região central do Estado do Rio Grande do Sul. Foi identificado a presença de soropositividade para os três agentes pesquisados. Os protozoários estudados estão disseminados entre a população canina, porém a soropositividade para *Leishmania infantum* em uma região considerada indene do RS, representa um possível risco para transmissão da leishmaniose em humanos.

A realização do inquérito sorológico, associado aos achados histopatológicos permitiu concluir que os animais foram infectados e mantiveram-se assintomáticos. A infecção ocorreu de forma disseminada sem predomínio de raça, e que acometeu animais de todas as idades e de ambos os sexos.

A alta ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, confirmou a endemicidade destes agentes na região central do RS, e caracterizou o cão como animal sentinela para estas infecções. Tal fato é de grande relevância, principalmente em casos de agentes zoonóticos, uma vez que os animais deste estudo não são errantes, os quais dividem o mesmo ambiente com os humanos, que estão expostos aos mesmos riscos.

Este estudo poderá contribuir com os serviços de Saúde Pública para elaborar medidas profiláticas e impedir a transmissão dos agentes zoonóticos aos seres humanos, bem como subsidiar políticas públicas de saúde na região central do RS.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 64, n. 1, p. 221-224, 2012.
- ALI, C. N. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3/4, p. 179-187, 2003.
- ALVES NETO, A. F. **Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de *Neospora caninum* a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes**. 2009. 68 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP.
- ANDREOTTI, R. et al. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 375-379, 2006.
- ARAÚJO, D. A. et al. Investigação dos fatores associados à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em cães e seres humanos de Porto Figuera, PR. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 1, p. 98-111, 2011.
- AZEVEDO, S.S. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 51-56, 2005.
- BARATA, R. A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.
- BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.
- BARBER, J.S. Neosporosis canina. **Waltham Focus**, v. 8, n. 1, p. 25-29, 1998.
- BASSO, W. et al. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 906-907, 2001.
- BENETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infections diseases of the dog and cat**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p. 735-748.
- BERG, J. M.; JOSEPH, R. J. Cerebellar infarcts in two dogs diagnosed with magnetic resonance imaging. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 2, p. 203-207, 2003.
- BERTOCCO, B. P.; BERTOCCO, C. P.; NEVES, M. F. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n. 10, 2008.

- BJERKAS, L.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.
- BOAVENTURA, C. M. et al. Prevalência de *Neospora caninum* em cães de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 15-22, 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: DF, 2006. 120 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral .pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf). Acesso em: 30 mai. 2016.
- BRASIL. Fundação Nacional de saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5. ed. Brasília: FUNASA, v. 2, p. 493-902, 2002. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia\\_vig\\_epi\\_vol\\_II.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_II.pdf). Acesso em: 01 ago. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica** conjunta número 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011. Disponível em: < [http://crmvms.org.br/files/materiais/nota-tecnica-no.-1-2011\\_cglab\\_cgdt1\\_lvc\\_98999048.pdf](http://crmvms.org.br/files/materiais/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc_98999048.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. reimpr. Brasília,DF, 2014. 120 p. Disponível em: < [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral \\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)>. Acesso em: 05 jul. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais [recurso eletrônico]** – Brasília: Ministério da saúde, 2016. 121 p. Disponível em: < <http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files/Manual%20de%20vigilancia,%20prevencao%20e%20controle%20de%20zoonoses%20-%202016.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2016.
- BRESCIANI K. D. S. et al. Clinical parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciência Rural**, v. 31, p. 1039-1043, 2001.
- BRESCIANI, K. D. S. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. **Ars Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 40-46, 2007.
- BRESCIANI, K. D. S. et al. Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 189-202, 2008.
- BRITO, A. F. et al. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 31-35, 2002.
- CABEZÓN, O. et al. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1505-1508, 2010.

- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-171, 1974.
- CANÓN-FRANCO, W. A. et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. **Veterinary Research Communication**, v. 28, n. 2, p. 113-118, 2004.
- CAÑÓN-FRANCO, W. A. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.
- CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 4, p. 518-519, 1911.
- CAVALCANTI, M. P. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, n. 58, p. 36-42, 2005.
- COELHO, W. M. D. et al. Detecção de co-infecções por *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma evansi*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 3, p. 169-174, 2013.
- COSKUN, S. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. **Veterinary Record**, v. 146, n. 22, p. 649, 2000.
- COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 320-325, 2007.
- CRINGOLI, G.; Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 307-313, 2002.
- CUNHA FILHO, N. A. et al. 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, supl. 1, p. 301-306, 2008.
- DALIMI, A.; ABDOLI, A. *Toxoplasma gondii* and Male Reproduction Impairment: A new Aspect os toxoplasmosis research. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 8, 2013.
- DANTAS, S. B. A. et al. 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.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1, 2009.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.
- DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica-SC. **Guia de orientação para vigilância de Leishmaniose Visceral canina (LCV)**, 2015. 24 p.

DUBEY, J. P. et al. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 60-64, 2007.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal Comparative Pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.

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

DUBEY, J. P. Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis and other tissue cyst-forming of human and animals. In: KRIER, J. P. **Parasitic Protozoa**, 2. ed. San Diego: Academic Press, p. 1-157, 1993.

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

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Saunders, 2006. 1387 p.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 1-59, 1996.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 447-456, 1970.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—the last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 90-108, 2011.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERREIRA, M. G. P. A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 150-154, 2009.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 453 p.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-896, 1970.

FRESCHI, C. R. et al. 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.

FREYRE, A.; BANEGAS, J. D. F. Toxoplasmosis em las espécies domésticas y como zoonosis. **Departamento de Publicaciones de La Universidad de la Republica do Uruguay**, Montevideo, n. 411, p. 332, 1989.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (FUNASA). **Leishmaniose**. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. 3. ed. 2001. Disponível em: < [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/control\\_vetores.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/control_vetores.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2016.

GARCIA, J. L. et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 99-104, 1999a.

GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do Norte do Paraná – Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999b.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 177-179, 2002.

GENNARI, S. M. et al. Presence of anti-*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 613-619, 2006.

GERMANO, P. M. L.; ERBOLATO, E. B.; ISHIZUKA, M. M. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 22, n. 1, p. 53-58, 1985.

GHARBI, M. et al. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. **Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics), v. 34, n. 2, p. 613-626, 2015.

GIRARDI, A. F. et al. 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. 1913-1922, 2014.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 247-252, 2006.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRAHAM, D. A. et al. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. **Veterinary Record**, v. 144, n. 24, p. 672-673, 1999.

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. et al. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 49-53, 2009.

- GUIMARÃES, A. M. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 1, p. 67-68, 1992.
- HEMPHILL, A. et al. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1175-1188, 1999.
- HIRSCHMANN, L. C. et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 44, n. 1, p. 33-44, 2015.
- JENKINS, M. C. et al. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 161-165, 2007.
- JITTAPALAPONG, S. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 138-141, 2007.
- KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 945-950, 2010.
- LEAL, P. D. S.; COELHO, C. D. Toxoplasmose em cães: uma breve revisão. **Coccidia**, v. 2, n. 1, p. 2-39, 2014.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, n. 82, p. 327-333, 1999.
- LOPES, M. G. et al. 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.
- LUCIANO, R. M. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania spp* e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3 p. 181-187, 2009.
- MADDISON, J. E. Making drug choices: rational antibacterial therapy. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 7, p. 469-475, 2009.
- MARSH, A. E. et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of parasitology**, v. 84, p. 983-991, 1998.
- MEERBURG, B. G. et al. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 24, p. 317-320, 2012.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. 1272 p.
- MELLO, V. Um cas de toxoplasmose du chien observe à Turin. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 6, n. 1, p. 10-15, 1910.

- MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: Desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, 2004.
- MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.
- MINEO, T. W. P. et al. 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.
- MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.
- MOURA, A. B. et al. 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, p. 52-56, 2009.
- PAIVA, J. B. et al. Avaliação da ocorrência, fatores de risco e associações laboratoriais hematológicas para toxoplasmose em cães na região de Jataí – GO, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 10, n. 18, p. 502-509, 2014.
- PARE, J. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 1595-1598, 1998.
- PATITUCCI, A. N. et al. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, n. 2, p. 227-232, 2001.
- PETERS, M. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, n. 31, p. 1144-1148, 2001.
- PETERSEN, E. et al. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.
- REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 1, p. 221-227, 2001.
- REICHEL, M. P. et al. Neosporosis in a pup. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 3, p. 106-110, 1998.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed.- [Reimpr.]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 883 p.
- RIO GRANDE DO SUL. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2011. Disponível em: <[http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106\\_v.13,%20n.1,%20mar.,%202011.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106_v.13,%20n.1,%20mar.,%202011.pdf)>. Acesso em: 28 mai. 2016.

SANTOS, S. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and veterinary entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SANTOS, T. R. **Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos, cães e humanos da região sudoeste do estado de Mato Grosso**. 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, São Paulo, 2008.

SAWADA, M. et al. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 7, p. 853-854, 1998.

SILVA A. V. et al. Avaliação de fatores epidemiológicos na ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em cães atendidos em um hospital universitário. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 239-247, 2009.

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 29-33, 2005.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, S. R. **Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina**. 2009. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Centro de Pesquisas René Rachou) – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2009.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J. D. The first report of the principal vector of visceral leishmaniasis in Americas, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009.

SOUZA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F. Co-infecção entre leishmaniose visceral e erlichiose monocítica em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 113-117, 2008.

TEIXEIRA W. C. et al. Frequência 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.

TRANAS, J. et al. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

TREES, A. J. et al. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1195-1200, 1999.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Neosporosis in the United Kingdom. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 891-893, 2000.

ULLMANN, L. S. R. C. et al. Ações de vigilância continuada papel do cão como animal sentinela para toxoplasmose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 345-347, 2008.

VARANDAS, N. P. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do Estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 105-111, 2001.

WALDNER, C. L. et al. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 685-690, 1998.

WOUDA, W. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999.