

Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-Pr

Occurrence of anti-*Leishmania* spp., *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dog sera from Veterinary Hospital from Universidade Estadual de Londrina

Dauton Luiz Zulpo¹; João Henrique Artero de Carvalho Leite²;
Ivo Alexandre Leme da Cunha¹; Luis Daniel de Barros¹;
Alessandra Taroda¹; Valdair Elemar Camargo Júnior³;
Hanna Lia Ettiene Peruch Lemos dos Santos⁴; João Luis Garcia^{5*}

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de anticorpos contra *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário, da Universidade Estadual de Londrina. Amostras de 112 animais foram obtidas por venopunção jugular ou cefálica com posterior obtenção dos soros. Estas foram submetidas à técnica de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* spp, anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*. Dos 112 soros examinados, 13 (11,61%), 25 (22,32%) e 57 (50,89%) foram positivos para *Leishmania* spp., *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente. A co-presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e *N. caninum* foi observada em 6 (5,36%) amostras, anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. gondii* em 8 (7,14%), e anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em 18 (16,07%) amostras. A co-presença de anticorpos anti- *Leishmania* spp., anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* foi observada em 5 (4,46%) cães. Verificou-se uma maior prevalência de *Leishmania* nos animais positivos para *Toxoplasma* e *Neospora*, embora estes resultados não tenham sido estatisticamente significativos ($p \leq 0.06$). Os cães são importantes no ciclo epidemiológico das enfermidades em estudo, sendo estas doenças importantes do ponto de vista de saúde animal, ou de saúde pública. A região norte do estado do Paraná é uma área endêmica para leishmaniose tegumentar humana, portanto, estudos devem ser realizados para desvendar o real papel dos cães como reservatórios da *Leishmania* para seres humanos no estado.

Palavras-chave: Reação sorológica, leishmaniose, toxoplasmose, neosporose e população canina hospitalar

¹ Discente(s) do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: dau_zulpo@yahoo.com.br; ivoleme@gmail.com; daniel_vetuel@hotmail.com; aletaroda@gmail.com

² Discente do Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP. E-mail: jhcarvalhoite@hotmail.com

³ Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, UEL, Londrina, PR. E-mail: camargovaldair@yahoo.com.br

⁴ Discente do Curso de Residência em Medicina Veterinária, UEL, Londrina, PR. E-mail: hannahlep@hotmail.com

⁵ Prof. Dr. do Deptº de Medicina Veterinária Preventiva, UEL, Londrina, PR. E-mail: jlgarcia@uel.br

* Autor para correspondência

Abstract

The aim of this study was to detect the presence of IgG antibodies anti-*Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from a Veterinary Hospital from Universidade Estadual de Londrina. Blood samples from 112 animals were obtained by jugular venipuncture to obtain sera. The samples were tested by indirect immunofluorescence to detect antibodies anti-*Leishmania* spp., anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii*. Thirteen (11.61%), 25 (22.32%), and 57 (50.89%) samples were positive for *Leishmania* spp., *N. caninum*, and *T. gondii*, respectively. The co-presence of anti-*Leishmania* spp. and *N. caninum* was observed in 6 (5.36%), anti-*Leishmania* spp. and anti-*T. gondii* in 8 (14.7%), and anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* in 18 (16.07%) samples. The co-presence of anti-*Leishmania* spp., anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* was observed in 5 (4.46%) dogs. There was a higher prevalence of *Leishmania* in *Toxoplasma* and *Neospora* positive animals, however, these results were not statistically significant (range $p = 0.052$ $p = 0.06$). The dogs have an important role in the epidemiological cycle of these diseases, which are important in animal and public health. The northern state of Paraná is an endemic area for human cutaneous leishmaniasis, therefore, studies should be conducted to uncover the real role of dogs as reservoirs of *Leishmania* to humans in the state.

Key words: Serological reaction, leishmaniasis, toxoplasmosis, neosporosis and dog population hospital

Introdução

Os cães podem ser naturalmente infectados por protozoários e algumas espécies apresentam caráter zoonótico, constituindo sérios problemas de saúde pública. Dentre elas destacam-se a leishmaniose e a toxoplasmose (GUIMARÃES et al., 2009).

A leishmaniose é uma enfermidade causada pelo protozoário *Leishmania* e seu ciclo biológico ocorre no inseto vetor e no interior de células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados, onde o cão assume um papel importante (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; MAURÍCIO et al., 1999). De acordo com a espécie envolvida e a apresentação clínica, a doença pode ser classificada como visceral, tegumentar e mucocutânea (LAINSON; SHAW, 1987).

No Estado do Paraná, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta caráter endêmico em humanos (SILVEIRA et al., 1999), com notificação em 276 dos 399 municípios, principalmente no norte oeste do estado (LIMA; MINELLI; COMUNELLO, 2002). Casos autóctones de leishmaniose visceral (LV) não são descritos no Estado, porém cães e humanos com sinais clínicos compatíveis com LV vêm sendo observados (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009). O papel do cão na transmissão da LV é bem conhecido, sendo estes animais considerados o

principal reservatório da infecção para os humanos (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Dentro da cadeia epidemiológica da leishmaniose cutânea o papel do cão é ainda objeto de estudo, no entanto, observa-se que nas áreas endêmicas os cães também apresentam infecção pelo protozoário (FALQUETO et al., 1986; PITTNER et al., 2009).

O *Toxoplasma gondii* e o *Neospora caninum* são protozoários intracelulares obrigatórios que apresentam distribuição cosmopolita e estão intimamente relacionados a distúrbios neurológicos, gastrintestinais, respiratórios, oculares, musculares e às alterações imunológicas em cães (MINEO et al., 2001).

O cão é considerado um hospedeiro intermediário do *T. gondii* e a possibilidade de transmitir o parasita é restrita (GARCIA et al., 1999). No entanto, a presença de cães infectados apresenta importância epidemiológica uma vez que pode indicar a presença do agente na região e ser um risco potencial de infecção em humanos (LANGONI et al., 2006).

O *N. caninum* tem como hospedeiros definitivos os cães domésticos, os coiotes e dingos australianos, que são responsáveis pela eliminação de oocistos nas fezes. Como hospedeiros intermediários naturais estão os bovinos, equinos, caprinos, ovinos, cervos entre outros animais (DUBEY; SCHARES,

2011). Cabe ressaltar que o primeiro isolamento de *N. caninum* no Brasil foi realizado em um cão com sinais neurológicos (GONDIM et al., 2001). Além disso, o *N. caninum* é considerado um importante agente causador de abortamento em bovinos (DUBEY, 2003).

Considerando-se a importância dos agentes etiológicos para os cães, o presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência e possível co-existência de anticorpos anti-*Leishmania* spp., anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos na rotina da clínica médica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética e Experimentação Animal e obteve parecer favorável (nº60/08) para a realização da pesquisa.

Área de estudo

A cidade de Londrina (23°18'36"S/51°09'46"W) está localizada na região norte do Estado do Paraná, região sul do Brasil. Encontra-se a 610 metros de altitude acima do nível do mar e possui clima subtropical, com chuvas o ano todo e tendência a concentração de chuvas no verão. Possui temperatura média anual acima dos 21°C e população humana estimada de 506.701 habitantes (IBGE, 2011). A população de cães foi estimada em 127.677 animais.

Amostragem dos cães

No período de janeiro a dezembro de 2009 foram coletadas amostras biológicas de 112 cães. Estas amostras eram coletadas independente do motivo da consulta clínica e, sendo assim os animais apresentavam raças e idades distintas.

Amostras biológicas de sangue e obtenção de soro

Amostras de sangue foram obtidas através da venopunção da veia cefálica ou jugular dos animais e acondicionadas em tubos de ensaio para posterior encaminhamento ao laboratório de Protozoologia Veterinária da UEL. Após a obtenção do soro, o mesmo foi acondicionado em microtubo de polietileno e armazenado a -15°C até o processamento das amostras.

Imunofluorescência indireta (IFI)

As determinações dos títulos dos anticorpos anti-IgG contra *Leishmania* spp., *N. caninum*, e *T. gondii* foram realizadas por meio da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com Marzochi et al. (1980), Conrad et al. (1993) e Camargo (1974), respectivamente. As lâminas para pesquisa de anticorpos contra-*Leishmania* foram preparadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* e foram consideradas positivas quando os títulos foram maior ou igual a 40. As lâminas de IFI para *N. caninum* e *T. gondii* foram preparadas com as cepas NC-1 e RH, respectivamente e as amostras foram consideradas positivas quando os títulos foram maior ou igual a 25 para *N. caninum* e maior ou igual a 16 para *T. gondii*. O conjugado anti-IgG de cão (FITC – Sigma) foi padronizado para cada reação. Amostras controles positivo e negativo foram incluídas em todos os testes. As amostras consideradas positivas foram diluídas sequencialmente na base dois (*Leishmania* spp. e *N. caninum*) ou base quatro (*T. gondii*) até tornarem-se negativas.

Análise Estatística

A análise de associação entre os grupos foi testada pela análise de χ^2 com significância estatística determinada de $p \leq 0,05$.

Resultados

Das 112 amostras de soro canino analisadas, 57 (50,89%) cães apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, 25 animais (22,32%) apresentaram anticorpos anti-*Neospora caninum* e 13 amostras (11,61%) foram reagentes para anticorpos anti-*Leishmania* spp.

A análise de associações entre *Leishmania* e *Neospora* e entre *Leishmania* e *Toxoplasma* não foram significativas no teste de χ^2 , mostrando $p= 0,06$. A associação de *Leishmania* quando comparada junto com *Neospora* e *Toxoplasma* não foi significativa, porém revelou $p= 0,052$, mostrando uma proximidade a significância que é $p \leq 0,05$ (Tabela 1).

A IFI revelou 44 (39,29%) cães negativos

para os três agentes etiológicos pesquisados e, ao analisar a presença de positividade para apenas uma das enfermidades foi constatado que 36 (32,14%) animais eram positivos somente para o protozoário *T. gondii*, seis (5,36%) cães apresentaram anticorpos apenas contra o *N. caninum* e quatro amostras (3,57%) foram exclusivamente positivas para *Leishmania* spp. As associações entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* encontram-se na Tabela 2.

A correlação dos títulos de anticorpos para cada parasito com o número de animais avaliados pode ser observada na Tabela 3. A variação entre os títulos de anticorpos avaliados foi de 20 a 320 para *Leishmania* spp., 25 a 400 para *Neospora caninum* e 16 a 4096 para *Toxoplasma gondii*.

Tabela 1. Análise das reações de imunofluorescência indireta para *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* realizadas em soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina.

				P^1	OR	
	<i>N. caninum</i>					
	+	-	Total(%)			
<i>Leishmania</i>						
+	06 (46,1)	07	13 (11,6)	0,06	3,61	0,94<OR<13,9
-	19 (22,5)	80	99 (88,4)			
Total	25 (22,3)	87	112 (100)			
	<i>T. gondii</i>					
<i>Leishmania</i>						
+	8 (61,5)	5		0,06	1,63	0,44<OR<6,25
-	49 (49,5)	50				
	57 (50,9)	55				
	<i>T. gondii e N. caninum</i>					
<i>Leishmania</i>						
+	5 (38,4)	8				
-	13 (13,1)	86		0,052	4,13	0,99<OR<17,11
	18 (16,1)	94				

Qui-quadrado por Yates corrigido; OR: Razão de Chances.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 2. Resultado das associações entre a presença de anticorpos para *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* por meio da reação de imunofluorescência indireta de soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina.

<i>Leishmania</i>	<i>T. gondii</i>	<i>N. caninum</i>	Anticorpos em soros de cães	
			Animais	%
Neg	Neg	Neg	44	39,29
Neg	Neg	Pos	6	5,36
Neg	Pos	Neg	36	30,36
Neg	Pos	Pos	13	11,61
Pos	Neg	Neg	4	3,57
Pos	Neg	Pos	1	0,89
Pos	Pos	Neg	3	2,68
Pos	Pos	Pos	5	4,46
			112	100

Neg=negativo, Pos=positivo.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 3. Resultado da correlação entre o número de animais (N) e os títulos de anticorpos para *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, obtidos por meio da reação de imunofluorescência indireta de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina.

Título <i>Leishmania</i>	20	40	80	160	320
N=	19	2	2	2	7
Título <i>Neospora</i>	25	50	100	200	400
N=	17	3	3	0	2
Título <i>Toxoplasma</i>	16	64	256	1024	4096
N=	23	17	12	4	1

O título de 20 é considerado negativo para *Leishmania*.

Fonte: Elaboração dos autores.

Discussão

A cidade de Londrina é constituída por áreas urbanas de bosque com resíduos preservados da floresta original que cobria a cidade há cerca de 60 anos atrás. A presença de vetores e de animais silvestres nessa região estabelece um contato estreito com o homem e assim, parece criar um ambiente favorável a manutenção e disseminação deste agente. Nosso trabalho revelou que 11,6% dos cães avaliados apresentou anticorpos para *Leishmania* spp., demonstrando a presença do parasito na área do presente estudo. Contudo, no que diz respeito à leishmaniose tegumentar, ainda não está claro a importância do papel epidemiológico

do cão (DANTAS-TORRES, 2007; CASTRO et al., 2007). Santos et al. (2005) destacaram que a presença das formas clínica ou subclínica dessa doença na população canina associada à infecção humana sugere a participação dos cães como fonte de infecção na disseminação da doença.

Costa (2010) pesquisando anticorpos anti-*Leishmania* em cães de áreas urbanas do mesmo município do presente estudo, porém trabalhando com cães em locais de reciclagem e mata adjacente encontrou uma soroprevalência de 9,6%, resultado este semelhante aos nossos. Sendo assim, podemos sugerir que a presença do vetor parece estar distribuída de forma homogênea pela cidade.

No que diz respeito à leishmaniose tegumentar, Silva-Filho (2008) encontrou uma soropositividade de 8,3% em cães de assentamentos rurais das cidades de Arapongas e Alvorada do Sul, ambos localizados na região norte do Estado do Paraná. Entretanto, Reis et al. (2011) estudando a leishmaniose por *L. (V.) braziliensis* em cães no município de Bela Vista do Paraíso encontraram uma soroprevalência de 45,4%. Os autores salientaram que a alta prevalência foi devido ao ecossistema da região e por tratar-se de uma área endêmica para LT em humanos. Neste mesmo trabalho foi avaliada a fauna de flebotomíneos e a espécie predominante foi a *Lutzomyia whitmani*, confirmando a importância desta espécie na transmissão do agente.

Ainda, Pittner et al. (2009) investigaram a infecção por *L. (V.) braziliensis* na cidade de Maringá e detectaram a ocorrência de 24% dos animais positivos ao parasita. Lonardoní et al. (2006) estudando a LT em cães do município de Mariluz detectaram 19% dos animais soropositivos. Zanzarini et al. (2005), em um levantamento epidemiológico realizado em municípios da região norte do Estado do Paraná, observaram soropositividade em 55,2% dos cães avaliados. Em estudo realizado na mesma região, Silveira et al. (1996) relataram títulos significativos de anticorpos contra o protozoário em 18,2% dos cães avaliados. Esses índices elevados foram discrepantes do observado no presente estudo uma vez que todos os autores supracitados realizaram seus experimentos em áreas endêmicas para o parasito.

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp e anti- *N. caninum* foi observado em seis (5,4%) amostras. A infecção e co-infecção por leishmaniose e neosporose já foram descritas no Brasil e no mundo (TARANTINO et al., 2001; ANDREOTTI et al., 2005). Tarantino et al. (2001) relataram a co-infecção por *Leishmania infantum* e *Neospora caninum* em um cão jovem na Itália. Cringoli et al. (2002) descreveram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*N. caninum* em cães e, sugerem que a infecção por um destes protozoários

aumenta a susceptibilidade de infecção para o outro. Dados estes que corroboram com o presente estudo onde foi observada maior ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* nos cães soropositivos para *Toxoplasma e Neospora*, no entanto, esta associação não foi estatisticamente significativa.

A soropositividade encontrada nos cães para o *N. caninum* foi de 22,32% (25/112), concordando com estudos prévios. Fridlund-Plugge et al. (2008) revelaram uma soropositividade de 18,17% de cães urbanos, periurbanos e rurais do município de Curitiba. Ainda, estudos realizados em áreas rurais do Estado demonstraram uma prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* de 29,1%, como descrito por Romanelli et al. em 2007 em cães do município de Guarapuava, e de 21,6% como referido por Souza et al. em 2002 em cães da região norte do Estado.

Estudos pretéritos demonstram soropositividades distintas para *Neospora* entre cães no Brasil, uma vez que Lopes et al. (2011) descreveram 3,2% de positividade em cães do município de Teresina, Piauí; Cunha Filho et al. (2008) observaram 15,6% de cães soropositivos em Pelotas – Rio Grande do Sul; Bresciani et al. (2007) detectaram 15,7% dos cães avaliados no município de Araçatuba – São Paulo; Azevedo et al. (2005) detectaram a presença de anticorpos contra o *N. caninum* em 8,4% dos cães de Campina Grande – Paraíba; Mineo et al. (2004) demonstraram soropositividade de 9,2% em cães de Uberlândia – Minas Gerais; Gennari et al. (2002) detectaram anticorpos no soro de 10% e 25% em cães domiciliados e errantes do município de São Paulo – São Paulo; Varandas et al. (2001) encontraram uma ocorrência de 8,4% de anticorpos contra o *Neospora* nos cães avaliados do município de Jaboticabal – São Paulo.

Cabe salientar que no presente estudo a titulação encontrada nos cães reagentes para *Neospora caninum* foi de título 25, 50, 100 e 400, respectivamente em 17, três, três e dois cães. Na literatura é salientado que a doença clínica está associada a títulos > 1:800 (BARBER; TREES,

1996), valores estes não observados no presente trabalho.

A presença de anticorpos contra o *T. gondii* foi observada em 50,89% (57/112) dos cães avaliados, resultado este semelhante aos descritos por Bresciani et al. (2007) que detectaram positividade em 23,1% dos cães do município de Araçatuba; Souza et al. (2003) que observaram prevalência de 19,7% em cães da cidade de São Paulo; Moura et al. (2009) constataram 26% de cães positivos no município de Lages; Azevedo et al. (2005) relataram positividade em 45,1% em cães da cidade de Campina Grande; Mineo et al. (2004) observaram 30,3% dos cães reagentes no município de Uberlândia e Grösz et al. (2002) que observaram uma prevalência de 35% em Cuiabá no Mato Grosso. No entanto, nossa prevalência foi inferior à relatada por Garcia et al. (1999) que descrevem uma prevalência de 84,9% de cães positivos para *T. gondii* na cidade de Jaguapitã – Paraná. Outro estudo no Estado do Paraná realizado por Souza et al. (2003) relataram 34,3% dos cães sendo soropositivos ao *T. gondii*.

No nosso estudo, a titulação para os níveis de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foi de 16 (23/57 cães), 64 (17/57 cães), 256 (12/57 cães), 1024 (4/57 cães) e 4096 (1/57 cães). Observa-se que somente cinco dos 57 cães positivos para anticorpos de *T. gondii* apresentaram títulos maiores que 1:1024. Garcia et al. (1999) descreveram que cães com títulos acima de 1024 podem corresponder a fase aguda da toxoplasmose, no entanto, nenhum dos cães apresentou sinais clínicos condizentes com este protozoário.

Cães geralmente tornam-se infectados com o *T. gondii* através da ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos esporulados ou pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais. Isso reflete que o parasita está presente em nosso ambiente significando um potencial de risco aos humanos frente a infecção (CABRAL et al., 1998).

Foi observado que nove cães com títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. apresentaram co-infecção por *Neospora caninum* e/ou *Toxoplasma gondii*. A presença de co-infecção associada à leishmaniose visceral é descrita na literatura mundial e, alguns autores acreditam que por tratar-se de uma doença de caráter imunossupressor, pode favorecer o estabelecimento de outras doenças oportunistas. No que tange à leishmaniose tegumentar, pouco se sabe a respeito de sua associação com outras enfermidades e, por não ter sido realizado o sequenciamento das amostras não podemos estabelecer esta relação.

Os cães possuem papel fundamental no ciclo epidemiológico das enfermidades em estudo, sendo estas doenças de grande impacto na saúde pública. A região norte do Estado do Paraná é uma área endêmica para a leishmaniose tegumentar humana, portanto, estudos devem ser realizados para desvendar o real papel dos cães como reservatórios da *Leishmania* para seres humanos, bem como, possíveis associações com o *T. gondii* e o *N. caninum*. Outros estudos sobre os protozoários são necessários para elucidar a co-infecção dos agentes.

Referências

- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitology*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J. M.; SILVA, E. A.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. 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*, Amsterdam, v. 135, n. 3-4, p. 375-379, 2005.
- AZEVEDO, S. S.; BATISTA, C. S. A.; VASCONCELLOS, S. A.; AGUIAR, D. M.; RAGOZO, A. M. A.; RODRIGUES, A. A. R.; ALVES, C. J.; GENNARI, S. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 79, n. 1, p. 51-56, 2005.
- BARBER, J. S.; TREES, A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record*, London, v. 139, n. 18, p. 439-443, 1996.

- BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; NUNES, C. M.; SERRANO, A. C. M.; MOURA, A. B.; STOBBE, N. S.; PERRI, S. H. V.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. *ARS Veterinária*, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 40-46, 2007.
- CABRAL, D. D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, F. A.; DURAN, F. P. Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Uberlândia, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 7, n. 2, p. 87-90, 1998.
- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 143-169, 1974.
- CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Experimental Parasitology*, v. 117, n. 1, p. 13-21, 2007.
- CONRAD, P. A.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M.; BOM-DURANTE, R.; TUTER, G.; BREITMEYER, R.; PALMER, C.; THURMOND, M.; ARDANS, A. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, USA, v. 5, n. 4, p. 572-578, 1993.
- COSTA, L. *Ocorrência de anticorpos IgG anti – Leishmania spp em cães de locais de reciclagem e nas adjacências de uma mata urbana de Londrina – PR*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 106, n. 4, p. 307-313, 2002.
- CUNHA FILHO, N. A.; LUCAS, A. S.; PAPPEN, F. G.; RAGOZO, A. M. A.; GENNARI, S. M.; LUCIA JUNIOR, T.; FARIAS, N. A. R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do rio grande do sul, Basil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 17, p. 301-306, 2008. Suplemento 1.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-46, 2007.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.
- FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI-FILHO, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R. D.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 81, p. 155-163, 1986.
- FRIDLUND-PLUGGE, N.; MONTIANI-FERREIRA, F.; RICHARTZ, R. R. T. B.; PIZZOL, J. D.; MACHADO JUNIOR, P. C.; PATRÍCIO, L. F. L.; ROSINELLI, A. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná state, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 17, n. 4, p. 222-226, 2008.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 99-104, 1999.
- GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; D'ÁURIA, S. N. R.; CARDOSO, S. M. S.; KWOK, O. C. H.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 106, n. 2-3, p. 177-179, 2002.
- GONDIM, L. F. P.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, P. O.; JESUS, E. E.; RIBEIRO, M. B.; FERNANDES, H. S.; ALMEIDA, M. A.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; McALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of the encysted bradyzoites in gerbils. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.
- GRÖSZ, L. C. B.; FERNANDES, C. G. N.; MOURA, S. T.; TEIXEIRA, W. J. C. Inquérito soroepidemiológico da toxoplasmose canina no perímetro urbano de Cuiabá, Estado do Mato Grosso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, n. 3, p. 215-219, 2002.
- GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 18, p. 49-53, 2009. Suplemento 1.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *IBGE cidades*. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 08 jul. 2011.
- LAINSON, R.; SHAW, J. S. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R. *The leishmaniosis in biology and medicine*, London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-20.
- LANGONI, H.; MODOLO, J. R.; PEZERICCO, S. B.; SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; DA SILVA, A. V. PADOVANI, C. R. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Journal Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases*, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 142-148, 2006.
- LIMA, A. P.; MINELLI, L.; COMUNELLO, E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Anais Brasileiro Dermatologia*, v. 77, p. 681-692, 2002.
- LONARDONI, M. V. C.; BERNAL, F. H. Z.; SILVEIRA, T. G. V.; ANTUNES, V.; TEODORO, U.; JORGE, F. A.; ZANZARINI, P. D. Comparação entre a imunofluorescência indireta e aglutinação direta para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana em cães errantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1001-1008, 2006.
- LOPES, M. G.; MENDONÇA, I. L.; FORTES, K. P.; AMAKU, M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, W. J. S. Reação de Imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar Americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 22, p. 97-155, 1980.
- MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.
- MINEO, T. W.; SILVA, D. A.; COSTA, G. H.; VON ANCKER, A. C.; KASPER, L. H.; SOUZA, M. A.; CABRAL, D. D.; COSTA, A. J.; MINEO, J. R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 239-245, 2001.
- MINEO, T. W. P.; SILVA, D. A. O.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 414-417, 2004.
- MOURA, A. M.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E. B.; PISETTA, G. M.; HEUSSER JUNIOR, A. 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*, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 52-56, 2009.
- PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T. F.; ARRAES, S. M. A. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 61, p. 561-565, 2009.
- REIS, H. R.; LOPES-MORI, M. R.; REIS, C. R.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R. M.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.; TEDIM, A. V.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NABUT, L. B.; NAVARRO, I. T. Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina e fauna de Flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1083-1094, 2011.
- ROMANELLI, P. R.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V. S. O.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 82, n. 2, p. 202-207, 2007.
- SANTOS, G. P. L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M. C. A.; SANTOS, E. G. O. B.; SILVA, V. L.; PACHECO, R. S.; MOURA-CONFORT, E.; ESPINDOLA, C. B.; SOUZA, M. B.; PONTE, C. S.; CONCEIÇÃO, N. F.; ANDRADE, M. V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.
- SILVA FILHO, M. F. *Prevalência de anticorpos contra Toxoplasma gondii e Leishmania spp em humanos e cães de dois assentamentos rurais do norte do Estado do*

- Paraná, Brasil. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; TEODORO, U.; LONARDONI, V. V. C.; ROBERTO, A. C. B. S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.
- SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; TOLEDO, M. J. O.; BERTOLINI, D. A.; ARRAES, S. M. A. A.; VEDOVELHO-FILHO, D. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 12, p. 89-93, 1996.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniosis. In: GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1998. v. 1, cap. 13, p. 450-457.
- SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES-JUNIOR, J. S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *Journal of Parasitology*, Laurence, v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.
- SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M.; YAI, L. E. O.; D'ÁURIA, S. N. R.; CARDOSO, S. M. S.; GUIMARÃES-JUNIOR, J. S.; DUBEY, J. P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 12, n. 1, p. 1-3, 2003.
- TARANTINO, C.; ROSSI, G.; KRAMER, L. H.; PERRUCCI, S.; CRINGOLI, G.; MACCHIONI, G. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 77-83, 2001.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 43-51, 2009.
- VARANDAS, N. P.; RACHED, P. A. A.; COSTA, G. H. N.; SOUZA, L. M.; CASTAGNOLI, K. C.; COSTA, A. J. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e contra *Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do Estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 1, p. 105-111, 2001.
- ZANZARINI, P. D.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 109-118, 2005.