

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO
MESTRADO EM MEDICINA E BEM-ESTAR ANIMAL**

Daniela Gabriel Reggiani

**PERFIL LABORATORIAL E MOLECULAR PARA AGENTES
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES PARTICIPANTES DE
TRIAGEM PARA DOAÇÃO DE SANGUE EM MUNICÍPIOS DE SÃO
PAULO.**

São Paulo

2020

Daniela Gabriel Reggiani

**PERFIL LABORATORIAL E MOLECULAR PARA AGENTES
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES PARTICIPANTES DE
TRIAGEM PARA DOAÇÃO DE SANGUE EM MUNICÍPIOS DE SÃO
PAULO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Moraes Filho.

São Paulo

2020

R26 Reggiani, Daniela Gabriel

Perfil laboratorial e molecular para agentes transmitidos por carrapatos em cães participantes de triagem para doação de sangue em municípios de São Paulo / Daniela Gabriel Reggiani. – São Paulo, 2020.

57 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal) – Universidade Santo Amaro – 2020.

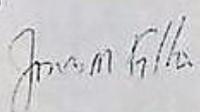
Orientador: Prof. Dr. Jonas Morais Filho

1. Hemoparasitoses. 2. Triagem de doadores. 3. Ehrlichia canis.
I. Morais Filho, Jonas, orient. II. Universidade Santo Amaro III. Título

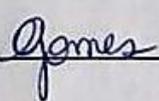
Programa de Pós-graduação Stricto Sensu
Medicina Veterinária - Mestrado
Ata de Dissertação

Ao **décimo sexto dia do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte**, via Webconferência, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 10h00min, o exame de Qualificação intitulada **"Perfil laboratorial e molecular para Rickettsia rickettsii, Ehrlichia canis, Rangelia vitalii, Babesia canis vogeli e Anaplasma spp. em cães doadores assintomáticos na cidade de São Paulo"**. Do(a) mestrando(a) **Daniela Gabriel Reggiani**, regularmente matriculado(a) no programa de Mestrado em Medicina Veterinária. Os requisitos exigidos foram cumpridos conforme registros constantes nos arquivos da Secretaria de Pós-graduação segundo encaminhamento do Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo presidente da banca examinadora e orientador Prof. Doutor Jonas Moraes Filho, Pós-doutorado em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo, que foi constituída pelos seguintes professores: Profa. Doutora Simone Gonçalves, Doutorado em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo. A banca examinadora, tendo decidido aceitar a pesquisa, passou à arguição do(a) aluno(a). Encerrados os trabalhos, deram o parecer final conforme consta a seguir:

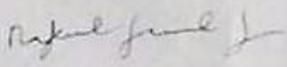
Prof. Doutor Jonas Moraes Filho

Parecer: APROVADO Assinatura: 

Profa. Doutora Simone Gonçalves

Parecer: Aprovado Assinatura: 

Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian

Parecer: APROVADO Assinatura: 

PARECER N. 11/2019

Projeto de Pesquisa: "Perfil laboratorial e molecular para *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma spp.* em cães doadores assintomáticos na cidade de São Paulo"

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Jonas Moraes Filho
Daniela Gabriel Reggiani

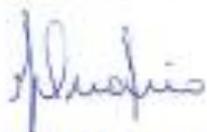
Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Aprovação** do Projeto "**Perfil laboratorial e molecular para *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* e *Anaplasma spp.* em cães doadores assintomáticos na cidade de São Paulo**".

São Paulo, 06 de junho de 2019.



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade Santo Amaro

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de todos, à Deus por ter aberto tantas portas maravilhosas que me trouxeram até aqui, e por sempre ter me mostrado que é na fé que encontro consolo e força para tudo em minha vida.

Agradeço aos meus pais que, desde as minhas primeiras conquistas, que hoje parecem tão pequenas, estavam perto me apoiando, enfrentando meus momentos de angústia e ansiedade. E que mesmo às vezes não entendendo a grandeza da conquista ou o que ela de fato representa para mim, demonstram muito orgulho. Vocês são meus exemplos de comprometimento e amor pelo que faz!

Agradeço a parceria infinita do meu irmão, meu melhor amigo, por ter dado graça e alegria aos meus piores dias! Sem a sua companhia eu nada seria!

Agradeço ao meu amor, Gui. É de longe a pessoa que mais me incentiva em todos os projetos da minha vida. Obrigada por ter vivido essa experiência ao meu lado, e obrigada por entender que é só o começo!

Agradeço aos meus avós por todo o amor dedicado a mim e por todo orgulho a cada apresentação feita.

Agradeço aos meus amores de 4 patas: Nalu e Tiana, que de tanto me fazerem companhia acabam de se formar Mestres também.

Agradeço à Simone, por toda parceria desde a primeira conversa relacionada ao mestrado, por ter me apresentado a Unisa e ter feito parte desse projeto comigo. Sempre será um grande exemplo de profissional para mim e também agradeço ao Professor Jonas, que além da paciência infinita e exemplo de profissional, se demonstrou grande parceiro que tenho orgulho de ter convivido esses 2 anos, me ensinando a levar a vida acadêmica de maneira leve, sem perder o comprometimento.

Agradeço aos meus colegas do Hemovet, que sempre me apoiaram, me deram força e colaboraram em todos os momentos que precisei! Obrigada pela parceria de sempre! Priscila, Jenniffer, Rebecca, Patrícia e Daiane.

Agradeço também aos meus amigos que fiz na Unisa: Caio, e Fernanda's, que trouxeram alegria aos meus dias! E aos outros professores maravilhosos que tive! Deram um toque especial nesses meus 2 anos!

Slow down, you're doing fine
You can't be everything you want to be
Before your time
(Billy Joel – Vienna)

RESUMO

As hemoparasitoses caninas são doenças causadas por microrganismos, transmitidas por carrapatos e comumente encontradas na clínica veterinária de pequenos animais. Essas doenças representam um problema histórico e emergente em diversos países do mundo, por sua alta prevalência, relevância e por riscos a saúde pública, já que algumas são consideradas zoonoses. O diagnóstico desses patógenos é um grande desafio na Medicina Veterinária o que o torna motivo de diversos estudos. A medicina transfusional vem crescendo dentro das práticas veterinárias devido à grande demanda e necessidade do uso de hemocomponentes em doenças específicas ou emergências. Esse aumento requer que os bancos de sangue refinem seus protocolos de coleta e produção de componentes sanguíneos para atender clínicas e hospitais. Dentro desse protocolo se encontra a triagem de doadores de sangue, crescendo assim a preocupação em relação aos mesmos, que passam por uma rigorosa triagem para serem aptos à doação, visando a não propagação de doenças infecciosas e cada vez mais oferecer um produto de boa qualidade para o receptor. O presente trabalho avaliou a infecção por *Anaplasma platys*, *B. canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *R. vitalii* e *R. rickettsii* em cães através do diagnóstico molecular e sorológico e correlacionou com os dados encontrados no hemograma durante a triagem para doação de sangue. De 159 amostras analisadas, 8,17% (13/159) foram positivas em PCR para pelo menos um agente, sendo que 3 amostras apresentaram infecção concomitante. Ao exame sorológico o resultado foi não reagente para todos os agentes. Apenas 7 amostras (4,40%) apresentaram alteração hematológica e dessas, apenas 1 estava relacionada ao agente *Ehrlichia canis*. Os resultados obtidos por esta pesquisa serviram para entender a importância de uma boa triagem de doadores de sangue canino em relação aos principais agentes infecciosos e compreender quais métodos diagnósticos podem auxiliar neste processo de maneira prática e rápida.

Palavras chaves: *Rickettsia rickettsii*, *Rangelia vitalii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, triagem de doadores, hemoparasitoses.

ABSTRACT

Canine hemoparasitosis are diseases caused by microorganisms, transmitted by ticks and commonly found in the veterinary clinic of small animals. These diseases represent a historical and emerging problem in several countries around the world, due to their high prevalence, generated and to public health risks, since they are considered zoonoses. The diagnosis of these pathogens is a major challenge in Veterinary Medicine, which is the reason for several studies. Transfusion medicine has been growing within veterinary practices due to the great demand and need for the use of blood components in specific diseases or emergencies. This increase requires blood banks to refine their blood component collection and production protocols to serve clinics and hospitals. Within this protocol is the screening of blood donors, thus increasing the concern in relation to them, who undergo a rigorous screening to be able to donate, taking the non-spread of infectious diseases and, increasingly, a good quality product to the receiver. The present work evaluated the infection by *Anaplasma platys*, *B. canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *R. vitalii* and *R. rickettsii* in dogs through molecular and serological diagnosis and correlated with the data found in the blood count during a blood donation screening. Of 159 analyzed, 8.17% (13/159) were positive in PCR for at least one agent, with 3 dissipated concomitantly. Upon serological examination, the result was not reagent for all agents. Only 7 defining (4.40%), altering hematology and of these, only 1 was related to the agent *Ehrlichia canis*. The results obtained by this research served to understand the importance of good screening of canine blood donors in relation to the main infectious agents and to understand which diagnostic methods can assist in this process in a practical and quick way.

Key words: *Rickettsia rickettsii*, *Rangelia vitalii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, screening blood donor, hemoparasitosis.

Lista de tabelas

Tabela 1. Locais das coletas e número de animais em cada região.....	29
Tabela 2. Primers utilizados para detecção de DNA de <i>A. Platys</i> , <i>B. canis vogeli</i> , <i>E. canis</i> , <i>R. vitalii</i> e <i>R. rickettsii</i> através da técnica de PCR em tempo real.....	33
Tabela 3. Alterações hematológicas encontradas em animais participantes de triagem de doação de sangue.....	35
Tabela 4. Perfil sorológico e hematológico de cães assintomáticos participantes de triagem de doação de sangue positivos para um ou mais agentes infecciosos e seus locais de coleta.....	36

Lista de abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMC	Erliquiose Monocítica Canina
EUA	Estados Unidos da América
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GFM	Grupo de Febre Maculosa
NEG	Negativo
PCR	Polymerase chain reaction- Reação em Cadeia da Polimerase
POS	Positivo
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SP	São Paulo
S.J. CAMPOS	São José dos Campos
TG	Grupo de Tifo
HT	Hematócrito
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Vetores.....	13
1.1.1	Parasitismo por carrapatos.....	13
1.1.2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	14
1.1.3	<i>Complexo Amblyomma Cajennense</i>	15
1.1.4	<i>Amblyomma aureolatum</i>	16
1.2	Medicina transfusional canina.....	17
1.2.1	Triagem para doação de sangue	17
1.3	Hemoparasitos.....	19
1.3.1	<i>Anaplasma Platys</i>	19
1.3.2	<i>Babesia canis vogeli</i>	20
1.3.3	<i>Ehrlichia canis</i>	22
1.3.4	<i>Rangelia vitalii</i>	24
1.3.5	<i>Rickettsia rickettsii</i>	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Geral	28
3.2	Específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Local e Período de realização	28
4.2	Cães.....	29
4.3	Hemograma.....	30
4.4	PCR.....	29
4.4.1	Extração de DNA	30
4.4.2	PCR em tempo real.....	30
4.5	Sorologia Snap ® 4dx Plus.....	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Resultados hematológicos.....	34
5.1.1	Hematócrito.....	34

5.1.2	Leucócitos totais.....	34
5.1.3	Contagem de plaquetas.....	34
5.1.4	Avaliação de esfregaço sanguíneo.....	35
5.2	Teste sorológico.....	35
5.3	PCR em tempo real.....	35
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONCLUSÃO.....	40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses são causadas por uma grande variedade de agentes que afetam o cão, animal doméstico que está há mais tempo servindo de companhia para o ser humano (OTRANTO et al., 2009). Essas doenças transmitidas por carrapatos são causa importante de morbidade e mortalidade em cães (DANTAS-TORRES, 2008) e esses patógenos são um problema emergente em todo o mundo (GOTTLIEB et al. 2016).

As interações entre animais, seres humanos e o ambiente em que ambos vivem fazem parte atualmente de um conceito de saúde unificado, conhecido como 'One Health' (ROBERTSON et al., 2014). A população canina em uma constante crescente, o papel social que eles têm em países desenvolvidos e sua relação cada vez mais estreita com os seres humanos representam preocupações com a saúde pública humana. Cães são competentes hospedeiros do reservatório de vários agentes zoonóticos e podem servir como fonte de nutrição para muitos artrópodes (OTRANTO et al., 2009).

As doenças transmitidas por vetores em animais de companhia possuem ampla distribuição na América Latina. Mas, em contraste com essa ampla distribuição, a disponibilidade e acessibilidade de dados sobre a ocorrência das diferentes doenças são muito diferentes para cada país e muitas vezes escassos. O fato de algumas das doenças e patógenos discutidos possuírem caráter zoonótico exige um forte apelo à prevenção de doenças em animais de companhia e uma abordagem de saúde única para a região (MAGGI e KRAMER, 2019).

As infecções hemoparasitárias representam um desafio diagnóstico importante, pois os sinais clínicos da maioria delas podem ser semelhantes. Além disso, existe a possibilidade de um único cão ser infectado com mais de um agente em áreas endêmicas (OTRANTO et al., 2009, 2010). Nesse contexto, a relação entre o agente infeccioso, o vetor e a resposta imune do cão os expõe ao risco da infecção por essas enfermidades e vão conduzir a gravidade ou não dos sinais clínicos (MOVILLA et al., 2017).

Para a confirmação diagnóstica deve-se incluir o histórico de exposição a carrapatos, sinais clínicos, achados do exame físico e a confirmação laboratorial, apoiada por resultados de testes sorológicos, citológicos e moleculares (OTRANTO et al., 2010). As técnicas moleculares (PCR) se tornaram o método de eleição para a

detecção de hemoparasitas em vertebrados e carrapatos, enquanto os testes rápidos sorológicos utilizados na clínica de rotina não diferenciam infecção ativa de exposição precedente (AKTAS et al., 2015). Dessa forma constituindo-se um desafio na rotina clínica de animais de companhia, em especial de cães.

Com o aumento no número de doenças com a necessidade da terapêutica envolvendo os hemocomponentes, as transfusões de sangue estão sendo realizadas rotineiramente em hospitais veterinários de pequenos animais; no entanto, essas práticas são insuficientemente relatadas na literatura e existem poucos consensos para orientar os protocolos de transfusão. Além disso, há controvérsia dentro da medicina veterinária relacionada à triagem de doadores de sangue, armazenamento de produtos sanguíneos, métodos de coleta, administração e protocolos apropriados para monitorar e tratar reações transfusionais (PRITTIE, 2011).

Com essa rotina crescendo nas práticas veterinárias, observa-se uma maior preocupação em relação aos doadores candidatos, que devem ser selecionados para doenças infecciosas para minimizar o risco de transmissão de doenças de transfusões de sangue (REINE, 2004).

1.1 Vetores

1.1.1 Parasitismo por carrapatos

Várias espécies de carrapatos são relatadas parasitando os cães no Brasil. Essa ocorrência está relacionada às características epidemiológicas particulares de cada ambiente. Por exemplo, no caso de áreas urbanas, a espécie mais comum em cães é o *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato comum do cão) (LABRUNA et al., 2001a; 2001b).

Na região neotropical, carrapatos que parasitam animais silvestres são relatados com grande assiduidade parasitando cães de áreas rurais, tendo espécies do gênero *Amblyomma* como principal (LABRUNA et al., 2000), concluindo que o acesso livre dos cães às áreas naturais ajuda a manter as populações desses carrapatos (SZABÓ et al., 2001; QUEIROGAS et al., 2010). Além disso, determinadas espécies de carrapatos têm preferências ambientais e especificidade por hospedeiros, que são variáveis de acordo com a espécie (SZABÓ et al. 2009).

Neste contexto, na região Sudeste, existem relatos que as espécies encontradas com maior frequência em cães de área rural são *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) (LABRUNA et al., 2001a, 2001b; MARTINS et al., 2016).

Os carrapatos são considerados os principais vetores responsáveis pela transmissão de patógenos para os animais domésticos e silvestres, sendo assim, os cães apresentam um papel importante no transporte desses ectoparasitos, fornecendo uma ponte para os agentes patogênicos entre ambientes naturais e regiões antropizadas (QUEIROGAS et al., 2010).

1.1.2 *Rhipicephalus sanguineus*

O carrapato *R. sanguineus* está presente em todos os continentes do planeta (exceto Antártida), onde parasita primariamente o cão doméstico. Embora ele tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo, levando consigo o cão doméstico (WALKER et al., 2000). A introdução do *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido durante colonização européia a partir do final do século 15, ou anteriormente, baseado em relatos de fósseis de cães domésticos no Peru, Bolívia e México datados de antes do século 15 (LEONARD et al., 2002). De qualquer forma, é possível que tenha havido múltiplas introduções em diferentes países do Novo Mundo, resultando em diferentes recombinações gênicas entre as populações estabelecidas (MORAES-FILHO et al. 2011).

Devido à sua relevância, é um dos carrapatos mais estudados por pesquisadores, visto que é o vetor de vários agentes causadores de doenças, como por exemplo, *Ehrlichia canis* (DANTAS-TORRES, 2008). Essa espécie é reconhecida como vetor da *R. rickettsii* nos Estados Unidos da América (EUA) e no México, sendo relatadas infecções em *R. sanguineus* por esse hemoparasito também no Brasil (BUSTAMANTE e VARELA, 1947; MORAES-FILHO et al., 2008).

No Brasil, *R. sanguineus* não era encontrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo e na região Sul até antes de 1906, quando já era abundante na Bahia, Sergipe, Maranhão, Pará, Mato Grosso e em algumas localidades da cidade do Rio de Janeiro. De 1910 em diante, esta espécie tornou-se mais abundante no Rio de Janeiro e nos demais estados das regiões Sudeste e Sul (ARAGÃO, 1911).

Nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por *R. sanguineus* em cães vêm aumentando. No Rio Grande do Sul, por exemplo, este carrapato foi citado de baixa ocorrência em 1947, tendo sido encontrado em apenas 1 (1,29%) de 77 cães examinados (CORRÊA, 1955). Cinco décadas mais tarde, este mesmo carrapato foi encontrado em 48,8% de 450 cães da cidade de Porto Alegre (RIBEIRO et al., 1997).

Atualmente, *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (LABRUNA, 2004).

1.1.3 Complexo *Amblyomma cajennense*

O primeiro relato que se tem da espécie *Amblyomma cajennense* foi na cidade de Cayena na Guiana Francesa (GUGLIELMONE et al., 2006) e é conhecido popularmente como “carrapato estrela” no Brasil, com referência à sua fase adulta.

Estudos genéticos, morfológicos, e biológicos feitos recentemente demonstraram que o complexo *Amblyomma cajennense* é composto por seis espécies de carrapatos, duas delas descritas no Brasil – *Amblyomma cajennense sensu strictu* e *Amblyomma sculptum* (LABRUNA et al., 2011; NAVA et al., 2014).

No Brasil, carrapatos *A. cajennense sensu strictu* (s.s.) e *A. sculptum* foram encontrados em áreas de transição, compostas por biomas de Floresta Amazônica e Cerrado, sendo o *A. cajennense* s. s. restrito à áreas de bioma Amazônico, enquanto o *A. sculptum* foi encontrado em regiões do Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica (MARTINS et al., 2016).

Em ambientes antropizados, as capivaras foram descritas como principais hospedeiros silvestres. Já nas áreas rurais do sudeste do Brasil, os principais hospedeiros do *A. sculptum* são os equinos. (LABRUNA et al., 2001).

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* são os vetores da Febre Maculosa brasileira (FMB), sendo consideradas as espécies mais importantes na transmissão da doença *A. sculptum*, *A. aureolatum* e *A. ovale* (MORAES-FILHO, 2017).

Os carrapatos da espécie *A. sculptum* é o vetor da FMB no interior do Estado de São Paulo e geralmente são encontrados em regiões de Cerrado e áreas degradadas, como pastos sujos, matas ciliares, coleções hídricas e em locais com presença de equinos e capivaras. Sua maior incidência se dá de junho a setembro com alguns casos esporádicos durante todo o ano (PINTER et. al, 2016).

1.1.4 *Amblyomma aureolatum*

O carrapato *Amblyomma aureolatum* tem como habitat natural no Brasil primariamente a Mata Atlântica, local que possui as condições ideais de umidade e temperaturas que ocorrem durante o ano todo (PINTER et al., 2004). Além do sul e sudeste do Brasil, este ectoparasita apresenta grande distribuição pela América do Sul, como Uruguai, nordeste da Argentina e leste do Paraguai (GUGLIELMONE et al., 2003)

Nas áreas de floresta, os carrapatos *A. aureolatum* adultos alimentam-se de carnívoros silvestres (GUGLIELMONE et al., 2003). Em áreas rurais próximas às florestas, esses carrapatos acabam alimentando-se em caninos domésticos, propiciando a transferência desses ectoparasitas dos cães para o ser humano (GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004).

Na região metropolitana da cidade de São Paulo, este carrapato é o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da Febre Maculosa brasileira (FMB) (DIAS e MARTINS, 1939; VALLEJO-FREIRE 1947; PINTER et al., 2004). Comparado ao *A. sculptum*, este carrapato demonstra ser mais eficiente na manutenção da *R. rickettsii* (SOARES et al., 2012). Porém não é capaz de manter populações de carrapatos infectados pela transmissão vertical, pois fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma aureolatum* tiveram alta mortalidade e baixo desempenho reprodutivo quando infectadas (LABRUNA et al., 2011).

Soares et al. (2018) relatam que a espécie *A. aureolatum* demonstrou competência vetorial para *R. vitalii*, pois foi capaz de adquirir e transmitir o agente entre cães domésticos. No mesmo estudo é relatado que o carrapato em questão pode adquirir a infecção por *R. vitalii* pela alimentação dos estágios de ninfa e adulto em cães infectados e mantida no vetor por transmissão transovariana e perpetuação transestadial, tanto de larva para ninfa como de ninfa para adulto.

1.2 Medicina transfusional canina

As práticas na medicina transfusional canina vêm crescendo rapidamente nas últimas décadas, refletindo o conhecimento e práticas utilizadas em humanos. Conforme a necessidade e o uso dessa terapia aumentam, será

necessário a disponibilidade de doadores saudáveis (GIBSON e OGG, 2012).

A medicina transfusional vem se tornando cada vez mais acessível e introduzida na rotina das práticas veterinárias (REINE, 2004). A transfusão sanguínea é uma medida adotada em emergências para salvar vidas em diversas ocasiões, porém devemos lembrar que o procedimento tem seus riscos, tais como reações imunomediadas e não imunológicas tardias, como a transmissão de patógenos por meio do produto sanguíneo, que por sua vez pode ser evitada com uma rigorosa triagem dos doadores de sangue (WARDROP et. al. 2016).

1.2.1 Triagem para doação de sangue

Alguns fatores devem ser levados em consideração para selecionar um doador de sangue canino, como por exemplo, peso, idade, raça, temperamento e estado geral. São aceitos para o programa animais acima de 25 quilos, com idade inicial de 1 ano, podendo doar até seus 7 anos. Devem ser animais tranquilos e de temperamento dócil, o que pode estar ligado também à raça. A avaliação clínica deve ser feita para selecionar o doador, levando em conta o estado nutricional, estarem livres de ectoparasitas e com vermifugação e vacinações atualizadas (MOROZ e VIEIRA; 2015; GIBSON e OGG, 2012).

Assim como na medicina humana, alguns cuidados devem ser tomados para minimizar o risco de contaminação dos produtos sanguíneos, culminando na transmissão de doenças. Estes doadores devem ser testados para doenças infecciosas com o intuito de diminuir o risco de contaminação por meio da transfusão, que apesar de não haver tantos relatos desse tipo na medicina veterinária, corre o risco de não ser muito relatada (REINE, 2004). Apenas um artigo foi encontrado relatando infecção pós-transfusão sanguínea em um cão, sendo o agente envolvido a *Babesia gibsoni* (STEGEMAN, 2003).

Segundo Wardrop et. al. 2016, os patógenos testados para esses doadores devem seguir pelo menos 3 critérios: (1) ser possível causar infecção clínica nos receptores após a transfusão; (2) ser capaz de causar infecção subclínica nos doadores, a fim de serem considerados doadores saudáveis; (3) os patógenos podem ser detectados por meio de cultura ou outro método diagnóstico e; (4) a

infecção causada no receptor tem o potencial de se tornar uma doença grave, irresponsiva ou de difícil resposta ao tratamento antimicrobiano. Esse mesmo autor relata também a respeito de uma triagem mínima, envolvendo os seguintes agentes: *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Bartonella henselae*, *Bartonella vinsonii*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Leishmania donovani* e *Mycoplasma haemocanis*.

Apesar da clareza em relação à importância da triagem para doenças infecciosas nos doadores, alguns pontos tornam-se críticos para que ela seja realizada de forma competente, como por exemplo, a região e os tipos de patógenos mais observados, dificuldade na seleção dos testes e seus custos e o estado crônico de algumas doenças (REINE, 2004). Vale ressaltar a importância do conhecimento em relação à localização geográfica atual e anterior desse animal, a fim de relacionar a triagem para doenças infecciosas e áreas endêmicas para as mesmas (GIBSON e OGG, 2012).

Diversos métodos diagnósticos estão disponíveis para detecção de agentes infecciosos na triagem de doadores. Os ensaios de PCR amplificam sequências de DNA para cada agente e, quando positivos, indicam a presença de infecção, tornando esse método potencialmente mais adequado para a triagem do que as sorologias, pois estas detectam anticorpos, documentando a exposição prévia ao agente infeccioso, não indicando necessariamente uma infecção atual ou, quando no início, podem apresentar-se soronegativos (TABAR et al., 2008; CHANDRASHEKAR et al., 2010).

A doação de sangue é essencialmente um processo altruísta. Aqueles que doam estão em boa saúde; por causa disso, eles são menos propensos a necessidade de uma transfusão de sangue si mesmos. No entanto, existem benefícios diretos e indiretos para os doadores e suas famílias. As famílias de potenciais doadores com sorologia positiva para doenças transmissíveis pelo sangue são notificadas pelo banco de sangue para que seus cães possam receber avaliação e acompanhamento para descartar ou tratar as infecções, essas que, de baixo nível poderiam não ter sido detectadas até que causassem dano substancial ao animal (DeLuca, 2006).

1.3 Hemoparasitos

1.3.1 *Anaplasma platys*

A espécie *Anaplasma platys* pertence à Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae* e Gênero *Anaplasma* (FERREIRA et al., 2008). São bactérias gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórias de plaquetas, principalmente em cães. Esse agente é responsável pelo desenvolvimento de um quadro clínico denominado trombocitopenia cíclica canina (DUMLER et al., 2001).

Este hemoparasito foi descrito pela primeira vez em 1978 e nomeado como *Ehrlichia platys* (HARVEY et al., 1978), porém através da análise de um fragmento do gene 16S do rRNA houve uma reorganização taxonômica das famílias *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae*, sendo então renomeado como *Anaplasma Platys* (DUMLER et al., 2001).

O vetor do *A. platys* permanece incerto, porém existem diversas ocorrências de coinfeções com *E. canis* e *B. canis*, direcionando para o envolvimento do carrapato *R. sanguineus* (HARRUS et al., 1997b; SANOGO et al., 2006). Além disso, tanto *R. sanguineus* quanto outros gêneros de carrapatos (*Dermacentor* e *Ixodes*) têm sido descobertos naturalmente infectados em diferentes partes do mundo (INOKUMA et al., 2000; MOTOI et al., 2001; PAROLA et al., 2003; SANOGO et al., 2006; KIM et al., 2006).

O período de incubação da hemoparasitose é de 8 a 15 dias. A infecção caracteriza-se por ciclos de parasitemia e trombocitopenia que podem ocorrer com intervalos de 10 a 14 dias. Na primeira fase parasitêmica a trombocitopenia costuma apresentar valores de até 20 a 50 mil plaquetas/ μ L de sangue, com muitas células parasitadas (GREENE, 2006). Conforme a doença vai se tornando crônica, a trombocitopenia diminui assim como a quantidade de células parasitadas, dificultando a visualização das inclusões no esfregaço sanguíneo (FRENCH et al., 1983; DAWSON et al., 1991; TRAPP et al., 2006).

Grande parte dos cães infectados por esse agente é assintomática (CARDOZO et al., 2007). As manifestações clínicas mais frequentes que podem ocorrer são vômito, diarreia, linfadenomegalia, depressão e perda de peso. Anemia e leucopenia podem ser visualizadas nos exames laboratoriais (DAGNONE et al., 2001; MACHADO et al., 2010).

O diagnóstico pode ser realizado através da pesquisa de inclusões em esfregaços sanguíneos, porém o hemoparasito nem sempre estará presente na

amostra de sangue coletada, causando um falso negativo. Por ser uma doença de característica cíclica, observar o microrganismo dentro das plaquetas quando o animal está infectado não é simples (FRENCH; HARVEY, 1983). Isso acontece porque durante a infecção há uma diminuição no número de plaquetas, dificultando a visualização dos microrganismos. Essa baixa frequência de parasitos nos esfregaços sanguíneos torna esse método de diagnóstico falho (HARVEY et al., 1978; FRENCH; HARVEY, 1983; HIBLER et al., 1986, SWANGO et al., 1989).

Testes sorológicos também são utilizados na pesquisa de anticorpos, o que nem sempre vai indicar infecção clínica, mas apenas exposição ao agente (RIKIHISA, 1991; WOODY e HOSKIN, 1991). A técnica de PCR possui alta sensibilidade, especificidade e resultados rápidos.

O tratamento é realizado com antibióticos da família das tetraciclina como o hiclato de doxiciclina e a tetraciclina (MIRANDA, 2010). Esses antibióticos apresentam ação bacteriostática, de amplo espectro (WALKER et al., 2012) e são semi-sintéticos sendo, a tetraciclina de ação curta, e a doxiciclina de ação longa. A doxiciclina por ser lipossolúvel apresenta ampla distribuição nos tecidos (VALENTÍN et al., 2009).

1.3.2 *Babesia canis vogeli*

São conhecidas três subespécies de *B. canis* (CARRET et al., 1999): *B. canis canis* transmitida pelo *Dermacentor reticulatus* na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* em regiões tropicais e subtropicais e *B. canis rossii*, transmitida pelo *Haemophysalis leachi* na África do Sul (TABOADA & MERCHANT, 1991). A babesiose canina brasileira é uma doença onde possui como vetor o carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, sendo causada por hematozoários do gênero *Babesia* que parasitam, preferencialmente, eritrócitos jovens (MURASE et al., 1993). As espécies *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* são os agentes etiológicos da doença (CITARD et al., 1995; SCHETTERS et al., 1997).

Com relação a epidemiologia das subespécies de *Babesia canis* no Brasil, a *B. canis vogeli* é a mais diagnóstica em cães, quando comparada as outras subespécies, independentemente da idade ou raça do animal (TRAPP et al. 2002; DELL PORTO et al. 1993, PASSOS et al. 2005). Mas, em recentes estudos moleculares realizados no país também relatam casos da doença causada pela *B.*

gibsoni (TRAPP et al. 2006). São escassos os estudos, principalmente relacionados à caracterização molecular destes piroplasmídeos nas diferentes regiões climáticas do Brasil.

A doença pode manifestar-se sob as formas subclínica, aguda, hiperaguda ou crônica. A gravidade dos sinais e sintomas clínicos vai depender da espécie que está sendo responsável pelo parasitismo, com a idade e, resposta imune do hospedeiro (SCHETTERS et al., 1997). A forma aguda é mais observada quando as infecções são acometidas por *B. gibsoni* ou pela *B. canis* Rossi, podendo os animais que forem acometidos irem a óbito devido a doença. A forma hiperaguda, que é incomum, é mais observada em filhotes e normalmente está associada à intensa parasitemia do agente etiológico e histórico de alta infestação por carrapatos. No Brasil, a forma subclínica da babesiose canina é provavelmente a apresentação predominante nos cães infectados (LEISEWITZ et al., 2001).

As alterações sistêmicas e sinais clínicos se apresentam na forma aguda como anorexia, hipertermia, hematúria, icterícia, letargia, linfadenomegalia e esplenomegalia. Na forma hiperaguda, além dessas alterações, pode ocorrer choque, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada, estase vascular e hipóxia. Já na fase crônica, podem ser identificadas hipertermia intermitente e hiporexia (VIDOTTO e TRAPP, 2004; FURLANELLO *et al.*, 2005; DANTASTORRES e FIGUEIREDO, 2006).

Em relação aos achados hematológicos, podemos encontrar uma anemia normocítica normocrômica, variando de leve a moderada e trombocitopenia (FURLANELLO et al., 2005; VILELA et al., 2013).

Os métodos para diagnóstico do gênero *Babesia* se baseia na observação direta do agente ou na detecção de anticorpos (TABOADA, 1998). Apesar da alta especificidade do exame de esfregaço sanguíneo, o diagnóstico se torna totalmente debilitado, pois este exame apresenta baixa sensibilidade devido a variação da parasitemia e a não detecção do parasita não implica na ausência de infecção (VERCAMMEN et al., 1995). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA são técnicas utilizadas no diagnóstico indireto da doença, detectando anticorpos séricos em animais portadores do agente etiológico (TABOADA, 1998; VERCAMMEN et al., 1995). A técnica de ELISA é simples e sensível, porém pouco específica, pois há reação cruzada entre *B. canis* e *B. gibsoni* (BOBADE et al. 1989).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também é uma forma de

diagnóstico para detectar fragmentos de DNA de *Babesia* spp. e proporciona o diagnóstico em infecções agudas, subclínicas ou crônicas mesmo nos casos de baixa parasitemia (MACINTIRE et al., 2002).

1.3.3 Ehrlichia canis

Em diferentes partes do mundo, incluindo o continente americano, o carrapato *R. sanguineus* é o vetor principal da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC) (DUMLER et al. 2001). A EMC no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada por muitos como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais, principalmente pela elevada e disseminada infestação do carrapato vetor, pela inexistência de vacina, pela inexistência de imunidade adquirida eficiente, e pela complexidade, e muitas vezes ineficiência, dos protocolos terapêuticos (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; AGUIAR et al. 2007).

No carrapato *R. sanguineus*, há transmissão transestadial de *E. canis*, mas não transovariana (GROVES et al., 1975; DUMLER et al. 2001). As larvas e ninfas se infectam ao alimentarem-se em cães infectados na fase aguda da doença, mantendo-se infectadas até o estágio adulto (LEWIS et al., 1977). No carrapato o microorganismo se dissemina em hemócitos, para a glândula salivar, e a infecção do hospedeiro ocorre através das secreções salivares no sítio de alimentação do vetor (HARRUS et al., 1997a).

A patogenia da erliquiose canina envolve um período de incubação de oito a 20 dias. A doença é caracterizada por ser multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Em infecções experimentais, é possível diferenciar as três fases, mas em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares e a duração e severidade dos sinais clínicos é variável (HARRUS et al., 1997a; SANTAREM, 2003).

Durante o período de incubação os sinais clínicos são inespecíficos como letargia, anorexia, prostração, perda de peso, linfadenomegalia e hipertermia (HARRUS et al., 1997c; BORIN, et al., 2009), diferente da fase aguda, em que os sinais clínicos mais observados são hipertermia, secreção ocular e nasal, anorexia,

depressão, linfadenopatia, vasculite, sinais neurológicos (convulsões e ataxia), musculares e de poliartrite (GREENE e HARVEY, 1984). Petéquias, equimoses cutâneas e em mucosas, epistaxe, claudicação, mialgias e alterações oculares (uveíte, retinopatias e conjuntivite) também podem ser observadas ainda na fase aguda (BREITSCHWERDT, 2004; CASTRO et al., 2004). A letalidade é maior na fase crônica, podendo ocorrer exacerbação das manifestações clínicas da fase aguda acrescidas de complicações (CASTRO ET AL., 2004; MYLONAKIS ET AL., 2004).

O diagnóstico é feito com base na visualização de mórulas em células dos esfregaços de sangue periférico ou capa leucocitária, sorologia, cultura de microrganismos, imunoaglutinação e PCR (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008), que pode ser realizado a partir de material genético extraído de sangue total, medula óssea, linfonodos, soro e baço (HARRUS et al., 2004).

No Brasil, a EMC ocorre endemicamente em praticamente todas as cinco regiões, com freqüências de infecção geralmente entre 20 e 50% em populações caninas amostradas de forma aleatória, sem suspeita clínica (LABARTHE et al. 2003, AGUIAR et al. 2007; COSTA Jr. et al., 2007; TRAPP et al. 2006; SANTOS et al. 2009). No entanto, a região Sul apresenta um viés, isto é, enquanto o estado do Paraná apresenta freqüências de infecções >20% (DAGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006), semelhantemente às demais regiões do Brasil, os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentam freqüências mínimas, <5% (LABARTHE et al., 2003; SAITO et al., 2008).

Em estudo feito por LABARTHE et al. 2003, no Brasil, 49,5% dos cães testados positivos para *E. canis* não apresentavam sinais clínicos da infecção. A região Sudeste apareceu com 15,3% de assintomáticos (260/1162).

1.3.4 *Rangelia vitalii*

Rangelia vitalii é um protozoário parasita do Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmida, família Babesiidae. Até o momento não há informações detalhadas disponíveis sobre o ciclo de vida no hospedeiro invertebrado (carrapatos) e hospedeiros vertebrados (canídeos). Em cães domésticos, é encontrado no sangue dentro dos eritrócitos, leucócitos, e livres no plasma, enquanto nos tecidos parasita células endoteliais dos capilares sanguíneos

(SOARES et al., 2014).

A enfermidade pode manifestar-se de três formas clínicas: forma aguda ou ictérica, subaguda ou hemorrágica e forma crônica, sendo esta última, leve ou benigna (LORETTI e BARROS, 2004).

Os sinais clínicos descritos em cães com rangeliose incluem palidez de mucosa, seguido de icterícia, febre intermitente, apatia, anorexia, emagrecimento progressivo, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia, edema subcutâneo dos membros pélvicos e petéquias (FIGHERA, 2007). O sangramento através dos orifícios cutâneos e bordos das orelhas também são achados comuns no parasitismo por *R. vitalii* (LORETTI e BARROS, 2004).

A hipótese da existência de reservatórios silvestres de rangeliose é baseada em relatos, por esfregaço sanguíneo, de piroplasmas em canídeos das espécies graxaim-do-campo (*L. gymnocercus*) (RUAS et al., 2005) e cachorro-do-mato (*C. thous*) (PARAENSE; VIANA, 1948). Estas duas espécies são normalmente encontradas parasitadas com carrapatos do gênero *Amblyomma* e em estudos em laboratórios funcionam com hospedeiros para estes artrópodes. *Amblyomma aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma cajennense* são as espécies de carrapatos que foram encontradas parasitando caninos acometidos pela infecção por *R. vitalii* (LORETTI et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004; SOARES et al., 2011).

Em um estudo recente, foi relatado que a espécie *A. aureolatum* demonstrou competência vetorial para *R. vitalii*, pois foi capaz de adquirir e transmitir o agente entre cães domésticos, mas as espécies *A. ovale*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma cajennense* e *R. sanguineus* não foram vetores competentes de *R. vitalii*, pois não adquiriram a infecção após se alimentarem em cães infectados. No mesmo estudo é relatado que *Amblyomma aureolatum* pode adquirir a infecção por *R. vitalii* pela alimentação dos estágios de ninfa e adulto em cães infectados e a infecção por este agente é mantida neste carrapato por transmissão transovariana e perpetuação transestadial, tanto de larva para ninfa como de ninfa para adulto (SOARES et al., 2018).

Fazer um diagnóstico morfológico para diferenciação de espécies não é viável através do exame de esfregaço sanguíneo, pois as formas intraeritrocitárias de *R. vitalii* são morfológicamente muito similares ao piroplasma *Babesia canis vogeli*, que também infecta cães. Portanto o diagnóstico molecular por PCR é o método de

escolha para diferenciar essas espécies com sondas específicas ou por sequenciamento genético. (SOARES et al., 2011; LEMOS et al., 2012; SOARES et al., 2018).

O tratamento preconizado para a doença é a doxiciclina, o dipropionato de imidocarb ou o acetato de diminazeno. Tem-se empregado a mesma posologia usada na terapia de outras protozooses e riquetsioses sanguíneas de caninos, tais como a Babesiose e a Erliquiose, além da instituição de corticoterapia e, quando necessário, transfusão sanguínea. A administração de corticóides tem sido recomendada no tratamento da anemia hemolítica imunomediada secundária (BUCHELER et al., 1995).

1.3.5 *Rickettsia rickettsii*

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias gram negativas intracelulares obrigatórias, algumas com potencial zoonótico em diferentes partes do mundo (YU e WALKER, 2003). Recentemente, o gênero foi classificado em quatro grupos: Grupo de Febre Maculosa (GFM), Grupo de Tifo (TG), Grupo de Transição (TRG) e Grupo Ancestral (AG) (FRITZ et al., 2009).

No Brasil, foram descritas até o momento sete espécies de *Rickettsias*: quatro pertencentes ao grupo GFM, transmitidas por carrapatos (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephalii* e *R. amblyommatis*); uma transmitida por pulgas do grupo TGR (*Rickettsia felis*); *R. typhi* pertencente ao grupo TG, também transmitida por pulgas; e *R. belli* do grupo AG, relacionada com carrapatos (LABRUNA, 2009).

R. rickettsii é considerada a espécie mais patogênica (PAROLA et al., 2005), sendo relatada em diferentes países como Estados Unidos da América (EUA), México, Canadá, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil (DUMLER e WALKER, 2005; PADDOCK et al., 2008). A doença causada por essa bactéria é chamada de Febre maculosa das Montanhas Rochosas devido ao primeiro relatado ter ocorrido na região das Montanhas Rochosas nos EUA. No Brasil, é também conhecida como Febre Maculosa Brasileira (FMB) (LABRUNA, 2009).

Além de *A. cajennense*, a espécie de carrapato *A. aureolatum* é reconhecida como vetor de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo, onde *R. sanguineus* também é suspeito como vetor (LABRUNA, 2009). Em áreas de reserva de Mata Atlântica do litoral paulista, o *Amblyomma ovale* é responsável pela

transmissão da doença (SABATINI et al., 2010).

As capivaras no Brasil foram confirmadas como hospedeiros amplificadores para carrapatos *Amblyomma sculptum* (publicado como *Amblyomma cajennense*), pois desenvolvem uma rickettsemia longa (UENO et al., 2016; LABRUNA, 2009).

Entre os hospedeiros do *A. sculptum*, os cavalos ocupam um lugar de grande importância, assintomáticos, porém com titulações de IgG significativas e de longa duração. Porém, não são considerados amplificadores da bactéria devido ao período de rickettsemia ser curto (UENO, 2016).

O *A. aureolatum* é encontrado em áreas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste (PINTER et al., 2004). É o principal vetor da FMB na região metropolitana do Estado de São Paulo (MORAES-FILHO et al., 2008), e em locais endêmicos para a doença como o município de Mogi das Cruzes (EVANS et al., 2000).

Com a proximidade dos cães tanto em relação ao homem, quanto as áreas habitadas pelo vetor e pelos hospedeiros amplificadores das bactérias do gênero *Rickettsia*, observou-se nesses locais altos títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii*, considerando assim os cães como sentinelas na epidemiologia da FMB (CARDOSO et al. 2006, CUNHA et al. 2014). Com isso, vem-se utilizando testes sorológicos para detecção de anticorpos contra antígenos do GFM em cães de diferentes Estados brasileiros, principalmente na região sudeste do país (HORTA et al. 2007, MILAGRES et al. 2010, PACHECO et al. 2011, CUNHA et al. 2014).

Em um estudo recente de infecção experimental, cães expostos a um isolado brasileiro de *R. rickettsii* apresentaram febre, letargia, anorexia, anemia e trombocitopenia; sendo que um deles também tinha lesões oculares (PIRANDA et al., 2008). Dois casos de Febre maculosa Brasileira em cães relatados por Labruna et al (2009b) apresentaram diarreia, êmese, hematoquezia, hipertermia, anorexia, letargia e alterações neurológicas (ataxia e nistagmo). A única alteração laboratorial relatada foi leucocitose. O diagnóstico foi fechado através de análise molecular e sorológica (LABRUNA et al., 2009b).

Os métodos de diagnóstico específicos incluem Reação de imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de imunoglobulinas IgM e IgG (TAVARES, 2007); pesquisa direta da bactéria através de histopatologia/imunohistoquímica a partir de biópsia de pele e petéquias, ou em materiais de necropsia - lesões de pele, pulmão, fígado, baço, coração, cérebro e músculos (BRASIL, 2005); e técnicas de biologia molecular (PCR) (TZIANABOS et al., 1989).

Em cães, o tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível, com antibioticoterapia específica, pois quando realizado tardiamente pode não ser eficaz na prevenção de necrose tissular ou danos neurológicos (GASSER et al., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

As hemoparasitoses representam uma parcela importante das enfermidades encontradas na rotina dos clínicos veterinários, fazendo parte das principais doenças transmissíveis aos cães domésticos. Por muitas vezes o diagnóstico é feito através de alterações laboratoriais como trombocitopenia e anemia somadas ao histórico de contato com o carrapato.

O conhecimento dos patógenos mais frequentes nas regiões estudadas, assim como a associação com os vetores mais encontrados nesse tipo de ecossistema, auxiliam no esclarecimento da importância da fase assintomática das hemoparasitoses e quais destes patógenos realmente necessitam estar na triagem de doação de sangue, assim como qual o melhor método diagnóstico utilizado para esse tipo de atividade.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a presença da infecção por *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalii* e *Rickettsia rickettsii* em cães assintomáticos que participaram da triagem para doação de sangue.

3.2 Específico

- Determinar a frequência de infecção por *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalii* e *Rickettsia rickettsii* em cães assintomáticos;

- Correlacionar os dados laboratoriais do animal com o diagnóstico molecular do parasito causador da doença;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e período de realização

As amostras foram coletadas no período de Agosto de 2019 a Janeiro de 2020, de diferentes municípios do Estado de São Paulo, como Cotia, Sorocaba, Santana de Parnaíba, São Bernardo do Campo, Peruíbe, Ibiúna, São José dos Campos, Atibaia, Itapeverica da Serra, São Roque, Mairiporã, Embu das artes, Jundiaí e Guarulhos.

4.2 Cães

A amostragem coletada foi de conveniência, sendo utilizados 159 cães assintomáticos, machos e fêmeas de diferentes raças (Golden, Boxer, Rottweiler, Cane corso, Doberman, Dogue Alemão, Seter dog, Pastor Alemão, Akita e Labrador), com idade entre 1 e 7 anos. Esses animais eram oriundos de canis das regiões citadas, participantes de uma triagem para doação de sangue, seguindo os critérios de triagem (tabela 1). Antes da coleta de sangue esses animais passaram por um rápido exame clínico, aonde se observou coloração de mucosas, palpação de linfonodo e inspeção a fim de detectar ectoparasitas. Nenhum animal apresentou alterações e estavam livres de pulgas e carrapatos.

Tabela 1- Locais das coletas e número de animais em cada região.

LOCAL	Número de animais
Cotia	54
Sorocaba	9

Santana de Parnaíba	7
São Bernardo	14
Peruíbe	18
Ibiúna	2
Mairiporã	14
São José dos campos	4
Atibaia	10
Itapecerica da Serra	4
São Roque	6
Embu das Artes	6
Jundiaí	6
Guarulhos	5
TOTAL	159

4.3 Hemograma

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cefálica, com agulha descartável 25x7, em tubos plásticos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para a realização do hemograma e em tubo sem anticoagulante para a realização do exame sorológico. As amostras de sangue foram processadas em analisador hematológico. O hematócrito foi determinado por meio da técnica de microhematócrito e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços de sangue corados, em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X). Os parâmetros hematológicos reportados por Feldman et al. (2000) serão utilizados como valores de referência.

4.4 PCR

4.4.1 Extração de DNA

Os volumes foram acondicionados em tubos estéreis com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e mantidos congelados em temperatura de -4°C até a realização do processo de extração do DNA.

As amostras de sangue total foram processadas individualmente à extração de DNA, utilizando-se o “kit” de extração “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen®, USA), conforme instruções do fabricante.

4.4.2 PCR em tempo real

Os materiais obtidos da extração foram analisados para *E. canis* pela determinação da seqüência de nucleotídeos amplificados do gene *dsb* (tabela 2), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Dsb-321 (5'-TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA - 3'), Dsb-671 (5' - GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA - 3'), e a sonda TaqMan (5'-AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA - 3') 5' FAM/BHQ - 1 3', específica para a espécie *E. canis*, conforme previamente padronizado (DOYLE et al., 2005).

Os materiais obtidos da extração foram analisados para *R. vitalii* pela determinação da seqüência de nucleotídeos amplificados do gene *hsp70* (tabela 2), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados senso Rv751-770 (5'-GCG TAT CCC GAA GAT TCA AA- 3'); antisense Rv930-911 (5'- AGT GAA AGC GGT GCA ACA TC- 3'); sonda TaqMan [5'- 6-FAM (CCT TAT CAA ATC ATT CTT C) MGB NFQ -3']. Este par de primers corresponde a amplificação de um fragmento de 179-pb do gene *hsp70* de *R. vitalii* (SOARES, 2014).

Para detecção de *Rickettsia rickettsii* através de PCR, cada amostra de DNA extraído de sangue total foi testada individualmente pelo protocolo de real-time PCR descrito por Labruna et al. (2004). Este protocolo utiliza um par de primers (CS5 e CS6) que amplificam um fragmento de 147 nucleotídeos do gene citrato sintase de *Rickettsia* spp, associado a uma sonda interna fluorogênica (5' 6-FAM – BHQ-1 3') de 23 nucleotídeos (tabela 2). Este protocolo de PCR mostrou-se sensível o suficiente para detecção de uma única cópia do gene citrato sintase de *R. rickettsii*. Os fragmentos amplificados foram seqüenciados em seqüenciador automático de DNA, conforme previamente descrito (Guedes et al. 2005).

Os materiais obtidos da extração foram analisados para *Babesia canis vogeli* pela determinação da seqüência de nucleotídeos amplificados do gene *hsp70*

(tabela 2), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados senso hsp70-F (5'-GTCATCACTGTGCCTGCGTACT-3); antisensohsp70-R (5'-GCATGACGTTGAGACCGGCAAT -3); associado a uma sonda interna fluorogênica (5'- Hex/AGCGCCAGGCCACCAAGGACGCT-3'-IABIkFQ). Este par de primers corresponde a amplificação de um fragmento de 84-pb (pares de base) do gene *hsp70* de *Babesia canis vogeli* (Peleg et al. 2010).

As reações foram realizadas em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, conforme descrito por Doyle et al. (2005). A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas através do sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems – Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 2. Primers utilizados para detecção de DNA de *A. Platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis*, *R. vitalii* e *R. rickettsii* através da técnica de PCR em tempo real.

PATÓGENO	PRIMERS	GENE	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>A. platys</i> ¹	An1-	18s	5'CTCAGAACGAACACTGG-3'	KHATAT et al., 2017
	An2-	rRNA	5'CATTCTAGTGGCTATCCC-3'	
<i>B. canis vogeli</i> ¹	hsp7	<i>sp70</i>	5'-GTCATCACTGTGCCTGCGTACT-	PELEG et al., 2010
	hsp7		3'	

<i>E. canis</i> ¹	Dsb-321		5'- TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA -3'	DOYLE et al., 2005
		<i>dsb</i>		
	Dsb-671		5'- GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA-3'	
<i>R. vitalii</i> ¹	Rv751-		5'- GCG TAT CCC GAA GAT TCA AA- 3'	SOARES, 2014
	Rv930-		5'- AGT GAA AGC GGT GCA ACA TC- 3'	
<i>R. rickettsii</i> ¹	Citrato sintase	CS5 CS6	5'GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGA T3' 5'AGGGTCTTCGTGCATTCTT3'	LABRUNA, 2004

¹ PCR em tempo real

4.5 Snap 4dx plus®

O teste SNAP 4DX plus® é um ELISA disponível comercialmente, usado como triagem para detecção simultânea de anticorpos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii* e antígeno de *Dirofilaria immitis* no sangue total, plasma, ou soro de cães, diagnosticando de forma rápida a confirmar a exposição de 6 patógenos transmitidos por vetores em uma única amostra, fornecendo assim informações valiosas sobre o risco relativo de doença (Stillman et al., 2014).

Segundo a IDEXX Laboratórios Incorporação®, o teste possui acurácia de: *Dirofilaria immitis* Sensibilidade 99.0% (94.3%–99.9%) – Especificidade 99.3% (97.4%–99.9%); *Anaplasma* Sensibilidade 90.3% (85.8%–93.7%) – Especificidade 94.3% (90.7%–96.7%); *Ehrlichia* Sensibilidade 97.1% (94.0%–98.8%) – Especificidade 95.3% (92.7%–97.2%); e *Borrelia burgdorferi* Sensibilidade 94.1% (88.3%–97.6%) – Especificidade 96.2% (92.9%–98.3%) (IDEXX, 2016).

Resumidamente, 3 gotas da amostra de soro foram misturadas com 4 gotas de conjugado e aplicadas à matriz de fluxo, como descrito nas instruções do fabricante. O antígeno analito específico (*D immitis*), se presente na amostra, se

ligaria ao anticorpo contra dirofilariose - HRP. Da mesma forma, o anticorpo específico do peptídeo (*Anaplasma*, *E. canis*, ou *B. burgdorferi*), se presente na amostra, se ligaria a o conjugado peptídeo-HRP. O teste foi então exposto à solução de lavagem e reagentes de substrato. O desenvolvimento de cor na área da deposição de complexos imunes indica um resultado positivo para os vários analitos.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados hematológicos

5.1.1 Hematócrito

Para interpretação dos hemogramas, os resultados hematológicos foram comparados com os valores de referência (MEINKOTH e CLINKENBEARD, 2000). O hematócrito foi considerado normal entre 37 e 55%, sendo valores inferiores interpretados como anemia. A anemia foi classificada como leve (30-37%), moderada (20-29%), severa (13-19%) e muito severa (menor que 13%).

Das 159 amostras analisadas, quatro apresentaram anemia (2,51%), sendo três classificadas como leves (1,88%) e uma moderada (0,62%) (tabela3).

A média de hematócrito dos animais foi de 46%. O valor mínimo encontrado foi de 29% e o máximo 55%.

5.1.2 Leucócitos totais

O valor de leucócitos totais considerado normal foi de 6000 a 17000 células/ μ l de sangue (MEINKOTH e CLINCKENBEARD, 2000). O valor mínimo registrado entre as 159 amostras foi de 3600/ μ l e o mais alto de 28800/ μ l.

Apenas um animal (0,62%) apresentou leucopenia (3.600/ μ l) enquanto outras três amostras (1,88%) observou-se leucocitose, variando de 18.400 a 28.800/ μ l. A média de leucócitos totais foi de 11.986/ μ l (tabela3).

5.1.3 Contagem de plaquetas

De acordo com os valores hematológicos de referência para cães de

Meinkoth e Clinkenbeard (2000), o número total de plaquetas considerado normal tem um intervalo de 200 a 500 mil/ μ l de sangue.

O maior valor de plaquetas do estudo foi de 476 mil/ μ l e o menor valor e único trombocitopênico encontrado foi de 146 mil/ μ l (tabela3).

Tabela 3. Alterações hematológicas encontradas em animais participantes de triagem de doação de sangue.

Animal	Hemácia (x 10 ⁶ / μ L)	Hgb (g/dL)	HT (%)	Proteína (g/dL)	Leucócitos (μ l)	Plaquetas (mil/ μ l)
9	4,89	11,3	34%	6	28.800	330.000
11	4,17	9,6	29%	10,4	5.500	240.000
21	5,76	13,3	40%	7	18.400	270.000
29	4,6	10,6	32%	11	3.600	200.000
30	5,76	13,3	40%	9,4	12.200	280.000
39	6,19	14,3	43%	6,4	20.000	390.000
152	4,08	10,5	35%	5,6	12.400	146.000

5.1.4 Avaliação do esfregaço sanguíneo

Não foi detectada microscopicamente em nenhum dos animais analisados a presença dos agentes em esfregaço sanguíneo.

5.2 Teste sorológico (SNAP 4dx Plus)

Todos os animais do estudo (159 amostras) obtiveram o resultado não reagente para anticorpos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii* e antígeno de *Dilofilaria immitis*.

5.3 PCR em tempo real

De 159 amostras processadas, 13 foram positivas para pelo menos um

agente (8,17%), sendo que sete (4,40%) foram positivas na PCR para *Babesia canis vogeli* e nove positivas para *E. canis* (5,66%). 3 amostras foram positivas para *B. vogeli* e *E. canis*.

Nenhuma amostra foi positiva para *Anaplasma platys*, *Rangelia vitalii* e *Rickettsia rickettsii* (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil sorológico e hematológico de cães assintomáticos participantes de triagem de doação de sangue positivos para um ou mais agentes infecciosos e seus locais de coleta.

Animal	Hemácia (x 10 ⁶ /µL)	Hgb (g/dL)	HT (%)	Leucócitos (µl)	Proteína (g/dL)	Plaquetas (mil/µl)	PCR <i>Anaplasma platys</i>	PCR <i>Babesia canis vogeli</i>	PCR <i>Ehrlichia a canis</i>	PCR <i>Rangeli a vitalii</i>	PCR <i>Rickettsi a rickettsii</i>	SNAP 4dx Plus	Local
5	6,7	15,6	47%	13.900	7,0	280	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Não reag	Cotia
9	4,89	11,3	34%	28.800	6,0	330	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Não reag	Cotia
16	7,2	16,6	50%	10.600	6,4	210	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Não reag	Snt. Parnaíba
32	6,91	16	48%	8.100	6,4	251	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Não reag	Sorocaba
49	7,9	18,3	55%	12.500	6,4	226	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Não reag	Ibiúna
59	6,91	16	48%	16.200	7,4	254	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Não reag	S. J. Campos
85	6,91	16	48%	9.700	7,2	200	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Não reag	Cotia
102	6,48	15	45%	15.400	6,4	320	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Não reag	Cotia
120	6,33	14,6	44%	14.200	7,4	300	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Não reag	Cotia
128	6,48	15	45%	11.800	7,0	305	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Não reag	Cotia
130	6,48	15	45%	11.600	7,4	370	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Não reag	Embu das Artes
133	6,91	16	48%	11.900	7,0	270	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Não reag	Embu das Artes
151	6,33	14,6	44%	6.900	5,6	230	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Não reag	Peruíbe

Pos: Positivo; Neg: Negativo; Não reag: Não Reagente; Snt. Parnaíba: Santana de Parnaíba; S.J. Campos: São José dos Campos

6. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a prevalência sorológica e molecular, assim como achados hematológicos em cães clinicamente saudáveis participantes de uma triagem para doação de sangue canino. No total, 8,17% (13/159) dos animais estavam infectados por um ou mais patógenos, sendo que, 3 (três) animais apresentaram infecção concomitante. Em um estudo realizado na Itália com animais candidatos a doadores de sangue revelou uma taxa considerável de exposição a patógenos transmitidos por vetores entre as populações de cães (26,7%). Embora os tutores tenham relatado o uso de medicamentos contra pulgas e carrapatos, seus animais tinham exposição a patógenos transmitidos por vetores assim como os cães de rua (VASCELLARI et al., 2016). Já no Reino Unido, o baixo número de resultados positivos na PCR para patógenos transmitidos por vetores obtidos, sugeriu que a prevalência desses agentes em uma população de cães saudáveis é baixa (1,52%) e que é improvável que o uso de hemoderivados represente um risco significativo de transmissão destes patógenos (CRAWFORD et al., 2013). No Brasil, o atual estudo é o primeiro relacionando a importância da triagem em animais doadores de sangue para patógenos causadores de hemoparasitoses.

Em animais doadores da Carolina do Norte (EUA) pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI), 9% dos candidatos a doadores de sangue foram sororreativos a um ou mais patógenos. A PCR foi utilizada neste estudo, apresentando resultado de 6% positivos para *Mycoplasma hemocanis* (BALAKRISHNAN et al., 2014). Os resultados do SNAP 4DX® para *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia burgdorferi* e *Dirofilaria immitis* foram todos não reagentes, assim como no presente estudo, aonde todos os animais foram não reagentes para o teste sorológico SNAP 4DX® plus.

Não há muitos estudos sobre o desempenho de testes sorológicos rápidos comumente usados para patógenos caninos transmitidos por artrópodes. Um trabalho feito em Hong Kong comparou um teste imunocromatográfico para essas infecções com um painel de reação em cadeia da polimerase (PCR) em cães sem sintomas clínicos. Ao final observaram uma concordância de 85,2% entre os testes. Os 24 discordantes ocorreram em testes envolvendo *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, que pode estar

relacionado ao tempo de infecção (WONG, 2011). No presente estudo observamos concordância de 100% relacionada ao agente *Anaplasma platys*, descrito também por Balakrishnan et al., 2014; porém para *Ehrlichia canis*, 9 animais foram positivos na PCR e não reagentes no teste sorológico. Isto provavelmente ocorreu porque o SNAP 4dx® Plus detecta sororreatividade de valores de títulos acima de 160, sendo que animais com nível de anticorpos abaixo desse ponto de corte não reagem ao teste (GREENE, 2015).

O uso de testes em conjunto (sorológico e molecular) não só resulta na detecção de exposição ou infecção de patógenos em um maior número de cães, como também auxilia na identificação de co-infecções que seriam perdidas caso apenas um método de teste fosse utilizado (MAGGI et. al., 2014; VASCELLARI et al., 2016; BALAKRISHNAN ET AL., 2014). As questões relacionadas à clínica, terapêutica e até à saúde pública representam um cenário em que decisões seriam tomadas erroneamente caso o uso de testes sorológicos e PCR fossem realizados em paralelo (MAGGI et. al., 2014); como em nosso estudo, em que cães seriam selecionados erroneamente se tivesse sido usado apenas o método sorológico, em que todos os animais foram não reagentes, porém quando usado em conjunto com a PCR obtivemos positividade para os agentes *B. canis vogeli* (7/159) e *Ehrlichia canis* (9/159).

Quanto à *R. vitalii*, existem poucos estudos sobre a prevalência e distribuição geográfica da Rangeliose canina no Brasil. Em um estudo prospectivo de 2 anos (2006-2008), esfregaços de sangue periférico e PCR foram feitos para observar a presença de piroplasmas de 103 cães no Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, e em apenas 6 casos as amostras de sangue deram positivo para o patógeno por PCR (Lemos et al., 2012). Recentemente, Silva et al., 2019, publicou um caso de rangeliose em São Paulo. O animal residia em região peri-urbana e tinha acesso a área de fragmentação de Mata Atlântica. Apesar da importância dessa doença em diagnósticos diferenciais para hemoparasitoses, não foi encontrado estudos em animais assintomáticos, dificultando entender sua importância em doadores de sangue. Vale ressaltar que cães apresentam a doença de forma muito aguda (FIGHERA et al., 2010), sendo dificilmente relatada em animais sem sintomas clínicos; como nos dados observados na presente pesquisa.

Não há relatos de infecções por *Rickettsia rickettsii* causando fases

subclínicas persistentes em cães (WARDROP 2016). Esse agente apresenta curto período de bacteremia, sendo assim muito difícil em diagnosticar na PCR. A ausência deste patógeno no estudo pode ter como justificativa o uso de apenas um método diagnóstico para sua detecção, sendo a sorologia considerada padrão ouro para detecção do agente. A sorologia em animais sentinelas como os cães é mais preconizada que o uso de testes moleculares, já que a detecção da bactéria no sangue é difícil. Isto se deve ao fato da bactéria se multiplicar dentro de células endoteliais e um baixo número destas células é encontrado livre na circulação em casos de doença branda (GEORGE et al., 1993).

Os animais com Erliquiose monocítica canina podem apresentar pancitopenia ou redução de apenas uma linhagem celular, sendo mais comum a trombocitopenia (THRALL, 2007), porém observa-se também a presença de anemia hemolítica, leucocitose ou leucopenia (HARRUS et al., 1997; KEMMING et al., 2004; IRWIN et al., 1991; BOOZER et al., 2003; DE CAPRARIIS et al., 2001; CODNER et al., 1992). A maioria dos animais do estudo com infecção por erliquiose não apresentaram alteração hematológica, sendo que o único animal com alteração apresentou uma anemia leve e leucocitose, como descrito acima.

A taxa de positividade molecular encontrada para *Babesia canis vogeli* em cães assintomáticos foi de 4,4%, coincidindo com Silva et. al. 2012, que encontrou uma taxa de 3,33% de positivos na PCR de uma amostragem randômica. Outro trabalho feito com animais sintomáticos revelou um valor muito parecido com esses. De 146 cães atendidos, 4,8% deles eram positivos para o agente (SILVA et. al. 2016). A comparação com esses estudos feitos no Nordeste brasileiro reforça a importância da presença da *B. canis vogeli* em cães assintomáticos e, principalmente da necessidade de inclusão dessa doença em protocolos de triagem de doação de sangue.

Os agentes a serem testados para a triagem de doação de sangue devem seguir a prevalência dos mesmos em cada região geográfica, portanto, os painéis de teste acabam diferindo consideravelmente dependendo da região em que o banco de sangue opera. Outro ponto importante é que não há um acordo firme sobre a frequência dos testes exigidos. Um histórico deve ser obtido em cada doação repetida e uma nova verificação completa deve ser

feita em cães que mostrarem qualquer sinal de doença clínica desde a última doação (DeLuca, 2006).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que existe a possibilidade de os animais serem portadores de alguns agentes infecciosos sem apresentar algum sintoma clínico e alteração hematológica, o que leva ao banco de sangue a selecionar cautelosamente o tipo de teste a ser utilizado nesta fase da infecção.

No presente estudo, a inclusão do teste molecular (PCR) no perfil laboratorial de doadores de sangue se fez indispensável, pois foi por meio desta técnica que revelamos a presença de 2 patógenos em animais assintomáticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; RIBEIRO, M.G.; SILVA, W.B. et al. Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, p.411-413, 2004.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARII, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 01, p. 126-132, 2007.

ARAGÃO, H. B. 1911. Notas sobre ixódidas brasileiros. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 3: 145-195.

AKTAS, M. et al. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 157, 2015.

BANETH G AND WEIGLER B Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Intern. Med.** 11: 365-370 (1997).

BANETH G. & WEIGLER B. 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Intern. Med.** 11(6):365-370.

BANETH G, MATHEW JS, SHKAP V, MACINTIRE DK, ET AL. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate Hepatozoon spp. **Trends Parasitol.** 19: 27-31. (2003).

BOBADE, P.A.; ODUYE, O.O.; AGHOMO, H.O. Prevalence of antibodies against Babesia canis in dogs in a endemic area. *Revue D'Élevage Et De Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*, v. 42, n. 2, p.211-217, 1989.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.

BÜCHELER, J., COTTER, S.M. **Canine immune-mediated hemolytic anemia**. In: Bonagura JD, Kirk RW (eds). *Kirk's current veterinary therapy XII – small animal practice*. Philadelphia: WB Saunders; 1995. p.152-7.

BULLA, C., KIOMI TAKAHIRA, R., PESSOA ARAUJO, J., JR., APARECIDATRINCA, L., SOUZA LOPES, R., WIEDMEYER, C.E., 2004, The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet Res** 35, 141-146.

BUSTAMANTE, M. E.; G. VARELA. 1947. Distribucion de las rickettsiasis en Mexico. **Rev. Inst. Salub. Enf. Trops.** 8:3-14.

BRAGA, A. Contribuição ao estudo experimental das piroplasmoses dos cães. **Bol Veter Exército** 1935; 3:1-16.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica/Ministério da Saúde**. 6a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. 12.

BREITSCHWERDT, E. B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 422-429, 2004.

CARINI, A., MACIEL, J. Sobre a moléstia dos cães, chamada nambi-uvú, e o seu parasita (*Rangellia vitalli*). **An Paul Med Cirurg** 1914; 3(2):65-71.

CARINI A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Rev Med** 1908; 22: 459-462.

CARDOSO L.D., FREITAS R.N., MAFRA C.L., NEVES C.V.B., FIGUEIRA F.C.B., LABRUNA M.B., GENNARI S.M., WALKER D.H. & GALVÃO M.A.M. 2006. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no município de Caratinga, Minas Gerais, **Brasil. Cad. Saúde Pública** 22(3):495-501.

CARDOZO, G.P.; OLIVEIRA, L.P.; ZISSOU, V.G.; et al. Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in 51 dogs from Brazil. **Braz. J. of Microbiology**, v. 38, p. 478-479, 2007.

CARRET, C. et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CASTRO, M. B; MACHADO, R. Z; AQUINO, L. P. C. T. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology.**, v. 119, p. 73-86, 2004.

CITARD, T. et al. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed restriction fragment length polymorphism analysis. **Tropical Medical Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 172-179, 1995.

CORRÊA, O. 1955. Carrapatos determinados no Rio Grande do Sul. *Biologia, Patologia e Controle*. **Arq. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor** 1: 35-50.

COSTA JR., L. M. C.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M. F. B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

CUNHA N.C., LEMOS E.R.S., ROZENTAL T., TEIXEIRA R.C., CORDEIRO M.D., LISBÔA R.S., FAVACHO A.R., BARREIRA J.D., REZENDE J. & FONSECA A.H. 2014. *Rickettsiae* of the Spotted Fever group in dogs, horses and ticks: an epidemiological study in an endemic region of the State of Rio de

Janeiro, Brazil. **Revta Bras. Med. Vet.** 36(3):294-300.

CHANDRASHEKAR, R., MAINVILLE, C. A., BEALL, M. J., et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **American Journal of Veterinary Research** 71, 1443-1450 (2010).

DAGNONE, A.S., DE MORAIS, H.S., VIDOTTO, M.C., JOJIMA, F.S., VIDOTTO, O., 2003, Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet Parasitol** 117, 285-290.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTO, M.C. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 191-201, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Vet Parasitol**, v. 141, p. 197-203, 2006.

DANTAS-TORRES F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet Parasitol** 2008; 152(3-4): 173-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>. PMID:18280045

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet Parasitol** 2008,152:173-185

DAWSON, J. E.; ANDERSON, B. E.; FISBEIN, D. B.; SANCHEZ, J. L.; GOLDSMITH, C. S.; WILSON, K. H.; DUNTLEY, C. W. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2741-2745, 1991.

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

DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted Fever in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V.1, n.2, p.103-108, 1939.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S.C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R.. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2001; 51, 2145-2165.

DUMLER, J.S. e D.H. WALKER. 2005. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and per sisting virulence. **N. Engl. J. Med.** 353: 551– 553. 3.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; et al. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n.17, n.1, p. 5-8, 2008.

FRITZ, C.L. Emerging Tick- borne Diseases. Veterinary Clinics of North America: **Small Animal Practice**, V.39, p.265-278, Mar 2009.

FIGHERA, R. A. Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**. V. 35 (supl 2): p. 261-263, 2007

FIGHERA, R.; SOUZA T. M.; KOMMERS G.; IRIGOYEN L. F.; BARROS C. S. L.Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesq. Vet. Brás.**, v. 30, n. 11, p. 974-987, 2010.

FORLANO M, SCOFIELD A, ELISEI C, FERNANDES KR, et al. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Vet. Parasitol.** 134: 1-7. (2005).

FURLANELLO T., FIORIO F., CALDIN M., LUBAS G. & SOLANO-GALLEGO L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy. **Vet. Parasitol.**, 134:77-85, 2005.

FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American**

Journal of Veterinary Research, v. 44, n. 12, p. 2407-2411, 1983.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic Diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an direct fluorescent antibody test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2407-2411, 1983.

GASSER, A. M.; BIRKENHEUER, A. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 1, p. 41-48, 2001.

GEORGE, F., BROUQUI, P., BOFFA, M.C., MUTIN, M., DRANCOURT, M., BRISSON, C. Demosntration of Rickettsia conorii-induced endothelial cell injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand fator in patients with Mediterranean spotted fever. **Blood**, 82(7):2109-16, 1993.

GIBSON, G. And OGG, A.A. In: DAY, M.J. e KOHN, B. **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**. 2. Edit. England. p. 289-290. 2012.

GONDIM, L.F.P.; KOHAYAGAWA, A.; ALENCAR, N.X.; BIONDO, A. W.; TAKAHIRA, R.K.;FRANCO, S.R.V. 1998. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**. 74:319-323.

GOTTLIEB J; ANDRÉ M.R.; SOARES J.F. et al. Rangelia vitalii, Babesia spp. and Ehrlichia spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. Braz. J. **Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 172-178, abr.-jun. 2016.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B . Detection of Rickettsia rickettsii in the tick Amblyomma cajennense in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 841-845, 2005.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. 2003. *Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region*. Houten, Holanda, **ICTTD-2**, 173pp.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. p. 115-138. In BARROSBATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (eds.), Carrapatos

de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: **Vox/ICTTD-3/Butantan**, 2006. 223p.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2006. 1387 p.

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine Ehrlichiosis. In GREENE, C.E. (ed):**Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia, W.B. Saunders, p.545-561, 1984.

GROVES, M.G., DENNIS, G.L., AMYX, H.L., HUXSOLL, D.L., 1975, Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). **Am J Vet Res** 36, 937-940.

HARRUS, S., BARK, H., WANER, T., 1997a, Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium of cont educ prat vet** 19, 431-441.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E. et al. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet Rec** 1997b;141:247–250.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997c.

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

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

HIBLER, S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.8, n. 2, p.106-114, 1986.

HORTA M.C., LABRUNA M.B., PINTER A., LINARDI P.M. & SCHUMAKER T.T.S. 2007. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, **Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102(7):793-801.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J Clin Microbiol.** 2000;38:4219–21.

KELLY, P.J.; XU, C.; LUCAS, H.; LOFTIS, A.; ABETE, J.; ZEOLI, F.; STEVENS, A.; JAEGERSEN, K.; ACKERSON, K.; GESSNER, A.; KALTENBOECK, B.; WANG, C. Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies. **PLoS ONE.** 2013; 8(1): e53450.

KIM, C.M.; YI, Y.H.; YU, D.H.; LEE, M.J.; CHO, M.R.; DESAI, A.R., et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. **Appl Environ Microbiol.** 2006;72:5766–76.

LABARTHE, N.; PEREIRA, M.C.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A. E HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdoferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p. 67- 75, 2003.

LABRUNA, M. B.; V. S. F. HOMEM; M. B. HEINEMANN, J. S. F. N. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, Eastern Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 774-776, 2000.

LABRUNA MB, KERBER CE, FERREIRA F, FACCINI JLH, DE WAAL DT, CENNARI SM. Risk factors to infections and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology.** 2001;97(1):1-14.

LABRUNA, M.; PEREIRA, M. Carrapato em Cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001a.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JR, J. S.; PACHECO R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.553-556, 2001b.

LABRUNA, M. B. 2004. Bioecologia de *Rhipicephalus sanguineus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 13(suppl.): 123-124

LABRUNA, et al. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences.** V. 1166, p156-166, May.2009.

LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerg Infect.** Mar. 2009b.

LABRUNA, M.B. et al. Rickettsioses in Latin American, Caribbean, Spain and Portugal. **Ver. MVZ Cordoba.** V.16, p.2435-2457, May/Aug. 2011.

LEISEWITZ, A.L.; JACOBSON, L.S.; DE MORAIS, H.S.; REYERS, F. 2001. The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 15:445–452.

LEONARD, J.A., WAYNE, R.K., WHEELER, J., VALADEZ, R., GUILLEN, S. & VILA C. 2002. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science** 298: 1613-1616.

LEMONS, T. D. et al. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.137-142, 2012.

LEWIS, G.E., JR., RISTIC, M., SMITH, R.D., LINCOLN, T., STEPHENSON, E.H., 1977, The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am J Vet Res** 38, 1953-1955.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia vitalli* em cães (—Nambiuvú,—Peste de Sanguell): uma revisão crítica sobre o assunto. **Arqs. Inst. Biológico**, São Paulo, v.71, p. 101-131, 2004.

LORETTI, A.P.; BARROS, S.S.; CORRÊA, A.M.; BREITSAMETER, I.; OLIVEIRA L.O.; PESCADOR, C.A. et al. **Parasitism of dogs by *Rangelia vitalli* in Southern Brazil: clinical, pathological and ultrastructural study** [trabalho 178]. In: XI ENAPAVE – XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária; 2003; Botucatu. Anais. Jaboticabal: FUNEP; 2003. p.178.

MACHADO, G.P.; DAGNONE, A.S.; SILVA, B.F. Anaplasmosse trombocítica canina – uma breve revisão. **Rev. Cient. Elet. Med. Vet.**, v. 15, 2010.

MACINTIRE, D.K., BOUDEAUX, M.K., WEST, G.D., BOURNE, C., WRIGHT, J.C., CONRAD, P.A., 2002. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southwestern United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 220, 325– 329.

MAGGI, R.G. et al. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. **Parasites & Vectors** 2014, 7:127

MAGGI, R.G., KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites Vectors** 12, 145 (2019).

MARTINS, T.F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto), **parasites & Vectors**, 9:186, 2016.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; PETERKA, C. R. L.; DE C PACHECO, R.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G. A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal Hematology of the Dog. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 163, p.1057-1063, 2000.

MIRANDA, M.G.N. Variação do status sorológico contra *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia canis* em *Canis familiaris* Linnaeus, 1758 após tratamento com hiclato de doxiciclina. 104p. **Mestrado (Dissertação)**. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica e Reprodução Animal. Universidade Federal Fluminense. 2010.

MILAGRES B.S., PADILHA A.F., BARCELOS R.M., GOMES G.G., MONTANDON C.E., PENA D.C.H., BASTOS F.A.N., SILVEIRA I., PACHECO R., LABRUNA M.B., BOUYER D.H., FREITAS R.N., WALKER D.H., MAFRA C.L. & GALVÃO A.M. 2010. Rickettsia in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern of Minas Gerais, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 83(6):1305-1307.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B; BARBOSA S. O; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA M. B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 9, p. 73-78, 2008.

MORAES-FILHO, J., MARCILI, A., NIERI-BASTOS, F.A., LABRUNA, M.B.

2011. Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America: molecular evidence for the presence of two distinct species. **Acta Tropica** 117(1):51-55.

MORAES-FILHO, J. Brazilian Spotted Fever. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, V.15, p.38-45, 2017.

MOROZ, L.R.; VIEIRA, J. Medicina transfusional. Em: JERICÓ M.M.; NETO J.P.A.; KOGIKA M.M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

MOTOI, Y.; SATOH, H.; INOKUMA, H.; KIYUUNA, T.; MURAMATSU, Y.; UENO, H. et al. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. **Microbiol Immunol**. 2001;45:89–91.

MACHADO, R.Z., 2004, Ehrlichiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 13 (suppl.), 53-57.

MOVILLA, R. et al. Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 131, 2017.

MYLONAKIS, M.E. et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, n.40, p.174-184, 2004.

NAVA S., BEATI L., LABRUNA MB., CÁCERES AG., MANGOLD AJ., GUGLIELMONE AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis** 2014; 5(3): 252-276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>. PMID:24556273

O'DWYER, L. H. et al. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 94, p. 143-150. 2001.

O'DWYER, L.H.; SAITO M.E.; HASEGAWA, M.Y. e KOHAYAGAWA, A. 2004. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo State, Brazil. **Parasitol. Res.** 94:240-242.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends Parasitol.**

2009;25:157–63.

OTRANTO, D. et al. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3316-3324, 2010.

OTRANTO, D. et al. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 55-60, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-55>

PACHECO R.C., MORAES-FILHO J., GUEDES E., SILVEIRA I., RICHTZENHAIN L.J., LEITE R.C. & LABRUNA M.B. 2011. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med. Vet. Entomol.** 25(2):148-155.

PADDOCK, C.D. et al. 2008. Rocky mountain spotted fever in Argentina. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 78: 687– 692.

PALUDO, G.R. et al. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.3-4, p.243-248, 2003.

PALUDO, G.R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A.; MACINTIRE, D.K.; WHITLEY E.M., Boudreaux M.K., Baneth G., Blagburn B.L. & Dykstra C.C. 2005. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitol. Res.** 97:167-170.

PARAENSE W.S e VIANA Y. 1948 Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Ibidem.** 46 (3): 595 – 603.

PAROLA, P.; CORNET, J.P.; SANOGO, Y.O.; MILLER, R.S.; THIEN, H.V.; GONZALEZ, J.P. et al. Detection OF *Ehrlichia* spp., *Anaplasmas* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. **J Clin Microbiol.** 2003;41:1600–8.

PAROLA, P.; C.D. PADDOCK & D. RAOULT. 2005. Tick borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin. Microbiol. Rev.** 18: 719–756.

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-

RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.

PINTER, A. et al. Study of the Seasonal Dynamics, Life cycle, and Host Specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, V.41, p.324-332, May.2004.

PINTER, A. et al. (Coord.). A febre maculosa brasileira na região metropolitana de São Paulo. BEPA, **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 13, n. 151, p. 3-47, 2016.

PIRANDA EM, FACCINI JLH, PINTER A, SAITO TB, PACHECO RC, HAGIWARA MK, et al. Experimental infection of dogs with Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2008;103:696–701

PRITTIE JE. Controversies related to red blood cell transfusion in critically ill patients. **J Vet Emerg Crit Care** 2010; 20(2):167–176.

QUEIROGAS, V. L.; OLIVEIRA, L. M.; MARQUES, R. L.; OLIVEIRA, D. S. F.; SZABÓ, M. P. J. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em cães domésticos no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás: Considerações epidemiológicas. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 347–349, 2010.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitol Res**. 2010; 107(5): 1115-1120.

REINE N.J. Infection and Blood Transfusion: A Guide to Donor Screening. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Vol 19, No 2 (May), 2004: pp 68-74

RIBEIRO, V.L.S., WEBER, M.A., FETZER, L.O. & VARGAS, C.R.B. 1997. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria. 27: 285-289.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichiaee and Ehrlichial diseases. **Clin Microbiol Rev** 1991;4:286-308.

ROBERTSON, L.J., UTAAKES, K.S., GOYAL, K., SEHGAL, R., 2014. Keeping parasitology under the One Health umbrella. **Trends Parasitol.** 30, 369–372.

RUAS J. L. Caracterização da fauna parasitária do *Pseudalopex gymnocercus* (graxaimdo campo) e do *Cerdocyon thous* (graxaim do mato) na região sul do Rio Grande do Sul. 2005. 62 f. **Tese (Doutorado em ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PortoAlegre, 2005.**

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; LOPES, V. V. A.; O'DWYER, L. H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 102, n. 2, p. 895-899, 2008.

RUBINI AS, PADUAN KS, MARTINS TF, LABRUNA MB, ET AL. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), 2009. **Vet. Parasitol.** 164: 324-327.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A. R.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 102-108, 2008.

SABATINI GS, PINTER A, NIERI-BASTOS FA, MARCILI A, LABRUNA MB. 2010. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the state of São Paulo, Brazil. **J Med Entomol** 47: 913-916.

SANOGO, Y.O.; DAVOUST, B.; INOKUMA, H.; CAMICAS, J.L.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. **Onderstepoort J Vet Res.** 2006;70:205–12.

SANTAREM, V. A. Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*. 127f. **Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.**

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SILVA A.B.; COSTA A.P.; SÁ J.C.; COSTA F.B.; SANTOS A.C.G. et.al. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em rhipicephalus sanguineus na mesorregião do oeste maranhense, Nordeste brasileiro. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.13, n.3, p. 388-395, jul./set. 2012.

SILVA V.C.L.; LIMA E.L.; DIAS M.B.M. ; FUKAHORI F.L.P.; RÊGO M.S.A. Parasitological and molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs of Recife, Pernambuco and evaluation of risk factors associated. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 163-172, jan./fev. 2016

SILVA BRF, LABRUNA MB, MARCILI A, SANTOS CR, BASTOS BBB, BORDIN JT, MORAES-FILHO J. *Rangelia vitalii* infection in a dog from São Paulo city, Brazil: case report. **Braz J Vet Res Anim Sci**. 2019;56(3):e150791.

SOARES, J. F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P.E.; SILVA, A.S.; FRANÇA, R.T.; LOPES, S.T.A.; LABRUNA, M.B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 153-167, 2011.

SOARES, J.F.; SOARES, H.S.; BARBIERI, A.M.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsia* the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Med. vet. entomol**. 2012; 26(2):139-51.

SOARES, J.F., DALL'AGNOL, B., COSTA, F.B., KRAWCZAK, F.S., COMERLATO, A.T., ROSSATO, B.C.D., LINCK, C.M., SIGAHI, E.K.O, TEIXEIRA, R.H.F, SONNE, L., HAGIWARA, M.K., GREGORI, F., VIEIRA, M.I.B., MARTINS, J.R., RECK, J., LABRUNA, M.B., 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in **Brazil.Vet. Parasitol**. 2014.

SOARES, J.F., COSTA, F.B., GIROTTO-SOARES, A., DA SILVA, A.S., FRANÇA, R.T., TANIWAKI, S.A., DALL'AGNOL, B., RECKB, J., HAGIWARA, M.K., LABRUNA, M.B. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelioidosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, p. 1221-1234, 2018.

SCHETTERS, T. P. et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, n. 5, p. 485-493, 1997.

STEGEMAN JR, BIRKENHEUER AJ, KRUGER JM, BREITSCHWERDT EB. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. **J Am Vet Med Assoc** 2003;222:959–963.

STILLMAN B.A., MONN M., LIU J., THATCHER B., FOSTER P., ANDREWS B.

et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **JAVMA**, Vol 245, No. 1, 2014.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In. ETTINGER, S.J. (Ed.): **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 3ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1989. v.1, cap. 46, p.277-281.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 25, n. 10–11, p. 909–916, 2001.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; M. B. CASTRO.; V. A. VERONEZ.; G. M. MAGALHÃES.; A. VOGLIOTTI.; J. M. B. DUARTE. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south–eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 1, 57–72, 2009.

TABAR, M. D., ROURA, X., FRANCINO, O., ET AL. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal of Small Animal Practice** 49, 325-328 (2008).

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R (1991). Babesiosis of companion animals and man. **Tick transmitted diseases**. 21 (1): 103- 123.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2 ed. Philadelphia:W. B. Saunders, p.473-481, 1998.

TAVARES, W.; MARINHO, L.A.C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MORAIS, H. S. M. de. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in south Brazil. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 16, n. 3, p. 365, 2002.

TRAPP, S.M., DAGNONE, A.S., VIDOTTO, O., FREIRE, R.L., AMUDE, A.M., DE MORAIS, H.S., 2006, Seroepidemiology of canine babesiosis and

ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B.E.; MCDADE, J.E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. **J Clin Microbiol.** 1989;27(12):2866–8. 32

UENO, et al. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. **Parasites & Vectors.** v9, p.499, Mar.2016.

VALLEJO-FREIRE, A. et al. Transmission of the Agent of Mexican Spotted Fever by *A.striatum*. **Memórias do Instituto Butantan**, V.20, 1947.

VALENTÍN, S.; MORALES, A.; SÁNCHEZ, J.L.; RIVERA, A. Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea. **Clin., Cosm. Invest. Dermatol.** v.2, p.129-140, 2009.

VERCAMMEN. F.; DE DEKEN, R.; MAES, L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p.51-55, 1995.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, suplemento 1, 2004.

VILELA J.A.R., PIRES M.S., DA SILVA C.B., PEIXOTO M.P., FALQUETO A., SANTOS H.A., SANAVRIA A., MASSARD C.L. & FACCINI J.L.H. Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 35(1):63-68, 2013.

WALKER, J.B., KEIRANS, J.E., HORAK, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World. **Cambridge University Press**, Cambridge, 643 pp.

WALKER, N.F., et al. Doxycycline and HIV infection suppress Tuberculosis-induced matrix metalloproteinases. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.185, p.989-997, 2012.

WARDROP K.J, BIRKENHEUER A., BLAIS M.C. et. al. Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. **J Vet Intern Med** 2016;30:15–35.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. ***Vet Clin North Am Small Anim Pract*** 1991;21:75-98.

YU, X.J.; WALKER, D.H. The Order Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed). ***The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community***. 3.ed. New York: Springer-Verlag, 2003.