

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

Bruna Regina Figura da Silva

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES COM
TROMBOCITOPENIA PROVENIENTES DA ZONA NORTE DE SÃO
PAULO: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS**

São Paulo

2019

Bruna Regina Figura da Silva

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES COM
TROMBOCITOPENIA PROVENIENTES DA ZONA NORTE DE SÃO
PAULO: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de 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

2019

Bruna Regina Figura da Silva

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES COM
TROMBOCITOPENIA PROVENIENTES DA ZONA NORTE DE SÃO
PAULO: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da
Universidade de 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, de de

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Conceito Final: _____

PARECER N.44.1/2017

Projeto de Pesquisa: "Aspectos clínicos, perfil laboratorial e molecular para *Rickettsia richettsii*, *Ehrlichia*, *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* em cães internados com quadro de trombocitopenia em Hospital veterinário localizado na cidade de São Paulo".

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Jonas Moraes Filho
Bruna Regina Figura da Silva

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 "**Aspectos clínicos, perfil laboratorial e molecular para *Rickettsia richettsii*, *Ehrlichia*, *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* em cães internados com quadro de trombocitopenia em Hospital veterinário localizado na cidade de São Paulo**".

São Paulo, de abril de 2018



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado, mesmo que em outro estado, me apoiando e incentivando à sempre ser a minha melhor versão, mantendo sempre a humildade e a honestidade.

À Deus por me manter saudável e disposta, sempre presente em meu caminho durante todas as fases, em especial às difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Moraes Filho por todo auxílio e orientação, independente da hora e situação.

Aos meus irmãos Helder e Isabela por serem minha base de amizade, companheirismo e amor incondicional.

À minha melhor amiga Carla, por todo apoio, por ser insubstituível e sempre estar ao meu lado desde que cheguei em São Paulo, sendo meu anjo da guarda sempre que mais precisei.

Ao Departamento de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, chefiado por Dr. Marcelo Bahia Labruna, pelo uso das instalações para que a parte experimental fosse realizada e por todo o apoio.

A todos os professores da UNISA, em especial ao Prof. Dr. Arlei Marcili, Prof. Dra. Adriana Cortez e Prof. Dra. Elizabeth Bohland por todas as críticas construtivas e compartilhamento de seus conhecimentos, essenciais para a elaboração desse trabalho.

Ao grupo de iniciação científica da UNISA, principalmente a Zahi e a Beatriz, por toda boa vontade em me auxiliar sempre que precisei.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À toda equipe do Hospital Veterinário São Sebastião, por terem participação assídua no meu crescimento como profissional.

À minha colega e amiga Jéssica Bordin, por ser parte essencial da construção desse projeto e por estar presente nos momentos de lazer tão necessários.

Aos meus cães Johnny, Fifi, Ramona, Raimundo, Bibi e Juninho pelo amor incondicional.

E, por fim, agradeço imensamente a cada um que em algum momento falou que eu não era capaz, pois só me fizeram acreditar ainda mais.

Dedico este trabalho ao meu eterno cão Tobias Augusto, por todo amor, compreensão e alegria que nos proporcionou quando em vida. Você foi o melhor cão do mundo.

RESUMO

As hemoparasitoses caninas são doenças transmitidas por artrópodes hematófagos e causadas por uma grande variedade de agentes. A espécie *Anaplasma platys* corresponde a parasitas intracelulares obrigatórias de plaquetas, principalmente em cães, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de um quadro clínico denominado trombocitopenia cíclica canina. A babesiose canina é uma doença transmitida por carrapatos, causada por hematozoários do gênero *Babesia*, no qual a *B. canis vogeli* é a mais prevalente no Brasil. A erliquiose monocítica canina (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. Outra enfermidade, pouco relatada, é a Hepatozoonose canina, causada pela ingestão do vetor infectado com o protozoário que atinge monócitos e neutrófilos do cão, levando à doenças com severidade variáveis. A Micoplasmose Canina é uma enfermidade pouco relatada, causada por bactérias que afetam os eritrócitos e que pode ser fatal em animais imunossuprimidos, esplenectomizados ou que apresentam co-infecções. Outra hemoparasitose importante em cães é a rangelirose ou nambyuvú (orelha que sangra), também conhecida como febre amarela dos cães ou peste do sangue, causada pela infecção por *Rangelia vitalii*. *R. rickettsii* é considerada a espécie mais patogênica entre as *Rickettsias*. A doença causada por essa bactéria é chamada de Febre maculosa das Montanhas Rochosas (RMSF) devido ao primeiro relatado ter ocorrido na região das Montanhas Rochosas nos EUA. No Brasil, é também conhecida como Febre Maculosa Brasileira e os carrapatos do gênero *Amblyomma* são os vetores. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de hemoparasitos em cães apresentando trombocitopenia, assim como relacionar com manifestações clínicas e alterações laboratoriais. Foram selecionadas 115 amostras de cães trombocitopênicos atendidos em Hospital Veterinário particular da zona norte de São Paulo/SP, sendo processadas por PCR em tempo real. 43 amostras foram positivas para ao menos um patógeno: *Hepatozoon* spp. (11,3%), *E. canis* (6,08%), *B. canis vogeli* (6,08%) e *A. platys* (0,86%). Coinfecções também foram detectadas: *B. canis vogeli* e *Hepatozoon* spp. (7,82%); *E. canis* e *Hepatozoon* spp. (1,62%); *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis* e *Hepatozoon* spp. (0,86%); *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *Mycoplasma* spp (0,86%); *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* (1,62%). As manifestações clínicas apresentadas foram sinais gastrointestinais, apatia, mucosas hipocoradas, hipertermia, perda de peso, sinais neurológicos, hematúria, alterações locomotoras, respiratórias, desidratação, linfadenopatias, hemorragias, icterícia, epistaxe e óbito. Em relação ao hematócrito, 33 apresentaram anemia, sendo 12 classificadas como leve; 16 (14,15%) moderadas; 3 (2,65%) severas e 2 (1,76%) muito severas. Das 115 amostras, onze (9,64%) apresentaram leucopenia, enquanto que em 31 amostras (27,43%) observou-se leucocitose. Houve diferença estatística entre os valores de hipertermia, icterícia, linfadenopatias, sinais locomotores e epistaxe.

Palavras-chave: Cão. Hemoparasitose. Trombocitopenia. PCR.

ABSTRACT

Canine hemoparasitoses are diseases transmitted by hematophagous arthropods and caused by a wide variety of agents. The species *Anaplasma platys* corresponds to obligate intracellular parasites of platelets, mainly in dogs, being responsible for the development of a clinical condition called canine cyclic thrombocytopenia. Canine babesiosis is a tick-borne disease caused by hematozoans of the genus *Babesia*, in which *B. canis vogeli* is the most prevalent in Brazil. Canine monocytic Erythritosis (EMC) in Brazil has presented increasing casuistry in hospitals and veterinary clinics, being considered by many as one of the most important communicable diseases in the small animal clinic. Another disease, little reported, is canine hepatozoonosis, caused by the ingestion of the vector infected with the protozoan that attacks monocytes and neutrophils of the dog, leading to diseases with variable severity. Canine Mycoplasmosis is a poorly reported disease caused by bacteria that affect erythrocytes and can be fatal in immunosuppressed, splenectomised or co-infected animals. Another important hemoparasitosis in dogs is rangeliosis or nambyuvú (ear that bleeds), also known as yellow fever of dogs or blood plague caused by infection by *Rangelia vitalii*. *R. rickettsii* is considered the most pathogenic species among *Rickettsiae*. The disease caused by this bacterium is called Rocky Mountain spotted fever (RMSF) due to the first reported occurring in the Rocky Mountain region in the USA. In Brazil, it is also known as Brazilian Spotted Fever. *Amblyomma* ticks are the vectors of Brazilian Spotted Fever (FMB). The objective of this study was to evaluate the occurrence of hemoparasites in dogs presenting thrombocytopenia, as well as to relate to clinical manifestations and laboratory abnormalities. A total of 115 samples of thrombocytopenic dogs treated at the Veterinary Hospital of the northern region of São Paulo / SP were selected and processed by real-time PCR. In real-time PCR, 43 results were positive for at least one pathogen: *Hepatozoon* spp. (11.3%), *E. canis* (6.08%), *B. canis vogeli* (6.08%), *A. platys* (0.86%). Coinfection was also detected: *B. canis vogeli* and *Hepatozoon* spp. (7.82%); *E. canis* and *Hepatozoon* spp. (1.62%); *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis* and *Hepatozoon* spp. (0.86%); *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. and *Mycoplasma* spp. (0.86%); *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. and *R. vitalii*. The clinical manifestations were gastrointestinal signs, apathy, hypochromic mucosa, hyperthermia, weight loss, neurological signs, hematuria, locomotor, respiratory alterations, dehydration, lymphadenopathies, hemorrhages, jaundice, epistaxis and death. In relation to the hematocrit, 33 presented anemia, 12 being classified as mild; 16 (14.15%) moderate; 3 (2.65%) severe and 2 (1.76%) very severe. Of the 115 samples, eleven (9.64%) similar leucopenia, whereas in 31 samples (27.43%) observed-leukocytosis. The separation is between the values of hyperthermia, jaundice, lymphadenopathy, locomotor signs and epistaxis.

Keywords: Dog. Hemoparasitoses. Trombocytopenia. PCR.

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Primers utilizados para detecção de DNA de *A. Platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis*, *Hepatozoon* spp., *Mycoplasma* spp., *R. vitalii* e *R. rickettsii* através da técnica de PCR em tempo real e convencional em cães com trombocitopenia da Zona Norte de São Paulo.....34
- Tabela 2** - Frequência de infecções por hemoparasitos em amostras de sangue de cães com trombocitopenia da Zona Norte de São Paulo detectadas por PCR em tempo real e convencional.....37
- Tabela 3** – Manifestações clínicas de cães com trombocitopenia, da Zona norte de São Paulo, positivos para hemoparasitos na PCR em tempo real e convencional.....39
- Tabela 4** – Diagnóstico molecular, manifestações clínicas e alterações laboratoriais em cães com trombocitopenia da Zona norte de São Paulo.....44

Lista de Abreviaturas

AG	Grupo Ancestral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMC	Erliquiose Monocítica Canina
EUA	Estados Unidos da América
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
GFM	Grupo de Febre Maculosa
MG	Minas Gerais
MT	Mato Grosso
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PR	Paraná
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
TG	Grupo de Tifo
TRG	Grupo de Transição
Ht	Hematócrito
“n”	Número
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Hemoparasitoses	9
1.2	Vetores	10
1.2.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	10
1.2.2	Complexo <i>Amblyomma Cajennense</i>	12
1.2.3	<i>Amblyomma aureolatum</i>	13
1.3	Hemoparasitos	15
1.3.1	<i>Anaplasma Platys</i>	15
1.3.2	<i>Babesia canis vogeli</i>	17
1.3.3	<i>Ehrlichia canis</i>	19
1.3.4	<i>Hepatozoon</i> spp	21
1.3.5	<i>Mycoplasma</i> spp	23
1.3.6	<i>Rangelia vitalii</i>	26
1.3.7	<i>Rickettsia rickettsii</i>	28
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Local e Período de realização	33
4.2	Coleta das amostras e exames laboratoriais	34
4.3	Extração de DNA	35
4.4	PCR em tempo real	36
4.5	PCR convencional	37
4.6	Cálculo Estatístico	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Amostras	39
5.2	PCR em tempo real	39
5.3	Manifestações clínicas	41
5.4	Resultados hematológicos	44
5.4.1	Hematócrito	44
5.4.2	Leucócitos totais	45

5.4.3	Número total de plaquetas.....	46
5.4.4	Análises Estatísticas.....	47
6	DISCUSSÃO.....	50
6.1	Infecção por <i>Anaplasma platys</i>	52
6.2	Infecção por <i>Babesia canis vogeli</i>	52
6.3	Infecção por <i>Ehrlichia canis</i>	53
6.4	Infecção por <i>Hepatozoon spp</i>	57
6.5	Infecção por <i>Mycoplasma spp</i>	59
6.6	Infecção por <i>Rangelia vitalii</i>	55
6.7	Infecção por <i>Rickettsia rickettsii</i>	56
7	CONCLUSÃO.....	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

O cão é o animal doméstico que está há mais tempo servindo de companhia para o ser humano. As doenças afetam esses animais diretamente por trazer sofrimento, além de gerar custos para os tutores e, indiretamente, trazendo riscos de transmissão de agentes patológicos com caráter zoonótico. As hemoparasitoses caninas são doenças transmitidas por artrópodes hematófagos e causadas por uma grande variedade de agentes (OTRANTO et al., 2009).

As hemoparasitoses são enfermidades de grande importância na clínica médica de pequenos animais, apresentando manifestações clínicas de intensidades variáveis, muitas vezes com prognósticos reservados. O diagnóstico definitivo muitas vezes não acontece na rotina, sendo o tratamento realizado com base nas alterações do exame físico, anamnese e presença de alterações no hemograma. Essa prática, pode gerar comprometimento do bem-estar do animal, descontentamento do tutor e resistência bacteriana, além de riscos para os contactantes e para o homem, devido ao caráter potencialmente zoonótico de alguns agentes.

Alguns hemoparasitos são pouco conhecidos pelos médicos veterinários clínicos, por falta de acesso à informação e/ou pelo número pequeno de relatos da ocorrência do mesmo em determinadas regiões. Um exemplo disso é a Rangeliose canina, doença pouco relatada em São Paulo e que pode trazer grandes riscos e divergências no prognóstico de cada paciente quando relacionada com outras hemoparasitoses.

Os artrópodes e as doenças transmitidas por eles têm se expandido por diferentes regiões do mundo, devido às mudanças climáticas e o acesso desses parasitas à certos nichos ambientais (SHAW et al., 2001). A incidência das hemoparasitoses varia, além de outros fatores, de acordo com as condições ambientais e propícias para cada tipo de vetor, sendo de extrema importância o estudo da capacidade vetorial e de transmissão de cada carrapato. Desta forma, o diagnóstico molecular das hemoparasitoses relacionado com a área geográfica estudada fornece dados epidemiológicos importantes para profilaxia, controle e tratamento das enfermidades.

1.1 Hemoparasitoses

As hemoparasitoses são doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores hematófagos (LABARTHE et al., 2003). Representam um desafio para clínicos veterinários devido à grande variedade e sobreposição de manifestações clínicas geradas por diferentes patógenos e, muitas vezes, por coinfeções com dois ou mais agentes (OTRANTO et al., 2009). O diagnóstico é feito através do histórico de contato do paciente com carrapatos, sinais clínicos compatíveis e achados no exame físico, além de confirmação por testes moleculares, citológicos e sorológicos (OTRANTO et al., 2009b).

Grande parte da casuística de hemoparasitoses na clínica médica de pequenos animais é causada por hemoprotozoários. No Brasil, até então, através da técnica de PCR, três espécies já foram detectadas: *Babesia canis vogeli* (PASSOS et al., 2005), *Babesia gibsoni* (TRAPP et al., 2006) e *Rangelia vitalii* (SOARES et al., 2011).

A bactéria *Ehrlichia canis* também tem sido reportada em cães em diversas regiões do Brasil (DAGNONE et al., 2009; SOUSA et al., 2013; MELO et al., 2016), principalmente em regiões tropicais e subtropicais, de acordo com a distribuição de seu vetor, a população classificada como Tropical do complexo *R. sanguineus* (MORAES-FILHOS et al., 2015).

Entre as manifestações clínicas que cães acometidos podem apresentar, destacam-se hipertermia, perda de peso, letargia/apatia, palidez de mucosas, linfadenopatias, hemorragias difusas, hematúria, icterícia, petéquias e até o óbito (IRWIN, 2001; HARRUS et al., 1997; KEMMING et al., 2004; IRWIN et al., 1991). As alterações laboratoriais mais comuns são trombocitopenia, anemia hemolítica, leucocitose ou leucopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hemoglobinúria e proteinúria (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).

1.2 Vetores

1.2.1 *Rhipicephalus sanguineus*

O carrapato *R. sanguineus* está presente em todos os continentes do planeta – com exceção da Antártida – e tem como hospedeiro primário o cão doméstico, podendo parasitar outros mamíferos, incluindo o homem e algumas espécies de pássaros. Embora ele tenha se originado na região Afro tropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo, acompanhadas pela presença dos cães (WALKER et al., 2000). A introdução do *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido durante a colonização europeia a partir do final do século 15, ou mesmo anteriormente, já que há 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).

O carrapato marrom do cão, *R. sanguineus*, pode ocasionalmente parasitar outros hospedeiros, incluindo humanos. Devido à sua relevância, é um dos carrapatos mais estudados por pesquisadores, visto que, em diferentes países, é o vetor de vários agentes causadores de doenças, como por exemplo *Rickettsia rickettsii*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* (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; DEMMA et al., 2005; MORAES-FILHO et al., 2008).

No Brasil, até meados de 1906, o carrapato *R. sanguineus* já era encontrando com abundância na Bahia, Sergipe, Pará, Mato Grosso, Maranhão e em algumas localidades da cidade do Rio de Janeiro, ao contrário dos estados de Minas Gerais, São Paulo e da região Sul do país. A partir de 1910 esta espécie passou a ser

encontrada com maior frequência no Rio de Janeiro e nos demais estados das regiões Sul e Sudeste (ARAGÃO, 1911; 1936).

Atualmente, *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (LABRUNA, 2004). Tal fato é retratado pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata este carrapato; até o início da década de 1980, não existia no mercado brasileiro nenhum produto comercial carrapaticida com indicação específica para tratamento de *R. sanguineus* em cães. Atualmente, há dezenas de produtos, das mais diversas formulações e apresentações, representando uma cifra considerável no faturamento da linha veterinária das indústrias farmacêuticas do Brasil (MORAES-FILHOS, 2013).

O táxon *Rhipicephalus sanguineus* foi utilizado, até o final do século XX, para representar uma única espécie de carrapato (WALKER et al., 2000). Porém, estudos consideraram diferenças biológicas, morfológicas e genéticas entre duas populações americanas de *R. sanguineus*, sendo uma do sudeste do Brasil e outra da Argentina (OLIVEIRA et al., 2005; SZABÓ et al., 2005). De acordo com Szabó et al. (2005), o gene 12S do DNA mitocondrial dos carrapatos argentinos assemelham-se aos da França, enquanto as sequências extraídas dos carrapatos do Brasil são semelhantes ao *Rhipicephalus turanicus* do Zimbawe. Moraes-Filho et al. (2010), encontraram diferenças genéticas baseadas no sequenciamento do gene 16S do DNA mitocondrial em amostras de carrapatos oriundas de diferentes localizações da América latina, além de África do Sul, Espanha e Itália. Além de corroborar com estudos recentes acerca de que existem ao menos duas populações de *R. sanguineus* no Novo Mundo (uma tropical e uma temperada), também foram encontradas diferenças entre os carrapatos da Espanha e da África do Sul.

1.2.2 Complexo *Amblyomma cajennense*

A espécie *Amblyomma cajennense* foi primeiramente descrita na cidade de Cayena na Guiana Francesa (GUGLIELMONE et al., 2006b).

Até recentemente, este taxón era representado por apenas uma espécie de carrapato, distribuída desde o sul dos Estados Unidos até o Sul do Brasil e Norte da Argentina (ESTRADA-PEÑA et al., 2004). Porém, estudos morfológicos, genéticos e biológicos recentes demonstraram que na realidade o complexo *Amblyomma cajennense* é composto por seis espécies de carrapatos, duas delas descritas no Brasil – *Amblyomma cajennense sensu strictu* (s.s.) e *Amblyomma sculptum* (LABRUNA et al., 2011; MASTROPAOLO et al., 2011; BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014)

No Brasil, carrapatos *A. cajennense sensu strictu* (s.s.) e *A. sculptum* foram encontrados em áreas de transição correspondentes aos estados do Maranhão, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rondônia. Estas regiões são 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).

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* são os vetores da Febre Maculosa brasileira (FMB), sendo *A. sculptum* (antigo *A. cajennense*), *A. aureolatum* e *A. ovale* (vetor da *R. parkeri*) consideradas as espécies mais importantes na transmissão da doença (PINTER et al., 2016; MORAES-FILHO, 2017).

Em áreas rurais do sudeste do Brasil, os principais hospedeiros do *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) são os equinos, sendo as capivaras descritas como principais hospedeiros silvestres em ambientes antropizados (LABRUNA et al., 2004; VIEIRA et al., 2004; LABRUNA et al., 2013; MARTINS, 2014).

A. sculptum é o vetor da FMB no interior do estado de São Paulo (PINTER et al., 2016). A taxa de infecção desse carrapato em condições naturais é muito baixa (menor ou igual à 1%) (GUEDES et al., 2005; KRAWCZAK et al., 2014)) e a

capacidade de infecção, transmissão transovariana e transestadial da riquetsia são consideradas baixas (<50%) (SOARES et al., 2012).

Os carrapatos da espécie *A. sculptum* 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, 2016).

1.2.3 *Amblyomma aureolatum*

O carrapato *Amblyomma aureolatum* possui grande distribuição pela América do Sul, incluindo áreas do sul e sudeste do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e leste do Paraguai (GUGLIELMONE et al., 2003). O habitat natural deste ectoparasita no Brasil é primariamente a Mata Atlântica, local que possui as condições ideais de umidade e temperaturas que ocorrem durante o ano todo (PINTER et al., 2004; BARBIERI et al., 2015).

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). Pouco se sabe sobre os hospedeiros das fases jovens, porém acredita-se que se alimentam de pássaros e algumas espécies de roedores (ARZUA et al., 2003; OGRZWALKA et al., 2012).

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) (GOMES 1933; DIAS e MARTINS, 1939; VALLEJO-FREIRE 1947; PINTER, 2003; PINTER et al., 2004). Este carrapato demonstra ser mais eficiente quando comparado ao *A. sculptum* na manutenção da *R. rickettsii* (SOARES et al., 2012), visto que demonstrou em laboratório total susceptibilidade à infecção com valores de 100% para

manutenção vertical por 4 gerações (LABRUNA et al., 2011). Porém, a transmissão vertical isolada não é capaz de manter populações de carrapatos infectados, pois fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma aureolatum* tiveram alta mortalidade e baixo desempenho reprodutivo quando infectadas (efeitos deletérios da infecção) (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 a infecção por este agente é mantida no vetor por transmissão transovariana e perpetuação transestadial, tanto de larva para ninfa como de ninfa para adulto.

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 cocóides ou elípticas, gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórias de plaquetas, principalmente em cães, sendo responsáveis 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., 2003; 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 e testes sorológicos, porém as duas técnicas podem resultar em falsos positivos e/ou negativos, visto que o hemoparasito nem sempre estará presente na amostra de sangue coletada e a presença de anticorpos nem sempre signifique infecção clínica, mas apenas exposição ao agente (RIKIHISA, 1991; WOODY e HOSKIN, 1991; COCKBURN, 1986). A técnica de PCR possui alta sensibilidade, especificidade e resultados rápidos (MILONAKIS et al., 2003).

O tratamento é realizado com antibióticos da família das tetraciclinas 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*

A babesiose canina brasileira é uma doença que possui como vetores os carrapatos 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 babesiose canina (CITARD et al., 1995; SCHETTERS et al., 1997). São conhecidas três subespécies de *B. canis* (CARRET et al., 1999): *B. canis* transmitida pelo *Dermacentor reticulatus* na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* em regiões tropicais e subtropicais e *B. canis rossi*, transmitida pelo *Haemophysalis leachi* na África do Sul (TABOADA e MERCHANT, 1991).

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 se manifestar sob as formas subclínica, aguda, hiperaguda ou crônica. A gravidade dos sinais clínicos depende da espécie que está sendo responsável pelo parasitismo, assim como 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 acometidos evoluírem para o óbito. 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. As formas aguda e hiperaguda raramente ocorrem no país, devido ao agente etiológico mais frequente ser a *B. canis vogeli* (LEISEWITZ et al., 2001)

Em relação às manifestações clínicas e alterações sistêmicas, na forma aguda da doença podem ser observadas anorexia, hipertermia, hematúria, icterícia, letargia e linfadenomegalia, além de esplenomegalia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e síndrome da disfunção de órgãos múltiplos. Na forma hiperaguda, além dessas síndromes, 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).

Os métodos para diagnóstico do gênero *Babesia* se baseiam na observação direta do agente ou na detecção de anticorpos (exames sorológicos). O agente pode ser visualizado nos eritrócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa ou pela coloração de Romanowsky (TABOADA, 1998). Este tipo de técnica mesmo sendo altamente específica, apresenta baixa sensibilidade pois a parasitemia é variável e a não detecção do parasita em esfregaço sanguíneo não implica na ausência de infecção (VERCAMMEN et al., 1995).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também é uma forma de diagnóstico para detectar fragmentos de DNA de *Babesia* spp. (FUKUMOTO et al., 2001). A PCR proporciona o diagnóstico em infecções agudas, subclínicas ou crônicas mesmo nos casos de baixa parasitemia (MACINTIRE et al., 2002). A PCR também pode ser utilizada para avaliação de terapia, detecção de animais portadores de *Babesia* spp. e em estudos epidemiológicos para a doença em diferentes ambientes climáticos (PERSING et al., 1992). A reação de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA são técnicas utilizadas no diagnóstico indireto da babesiose canina detectando anticorpos séricos em animais portadores do agente etiológico (TABOADA, 1998; VERCAMMEN et al., 1995; YAMANE et al., 1994; BOBADE et al., 1989). 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).

O tratamento é realizado com derivados de diamidinas e imidocarb (URQUHART et al, 1998). O prognóstico é bom, porém muitos animais tratados permanecem como portadores da doença, podendo dessa forma ocorrer recidivas (JONES et al., 2000).

1.3.3 *Ehrlichia canis*

As bactérias do gênero *Ehrlichia* são parasitas intracelulares obrigatórios gram-negativos que parasitam células hematopoiéticas, como monócitos, macrófagos e neutrófilos. Atualmente, cinco espécies compreendem o gênero: *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingi*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001). Dentre elas, *E. ewing*, *E. chaffeensis* e *E. canis* são as que parasitam os cães, sendo esta última a mais frequente (DAGNONE et al., 2003).

Em diferentes partes do mundo, incluindo o continente americano, o carrapato *R. sanguineus* é o vetor principal, se não o único, 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 (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; MACHADO 2004; AGUIAR et al., 2007b). No carrapato, há transmissão transestadial, mas não transovariana (GROVES et al., 1975; DUMLER et al., 2001).

No Brasil, a EMC ocorre endemicamente em praticamente todas as cinco regiões, com frequências de infecção geralmente entre 20 e 50% em populações caninas amostradas de forma aleatória, sem suspeita clínica (LABARTHE et al. 2003, AGUIAR et al. 2007b; COSTA Jr. et al., 2007; TRAPP et al., 2006; SANTOS et al., 2009). No entanto, na região Sul, enquanto o estado do Paraná apresenta frequências 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 frequências mínimas (<5%) (LABARTHE et al., 2003; SAITO et al., 2008). O baixo número de casos de infecção por *E. canis* na América Latina temperada (Chile, Argentina, Uruguai e estado do Rio Grande do Sul) pode ser devido à baixa competência vetorial dos carrapatos sob o táxon *R. sanguineus* desta região, ao contrário da América tropical (desde México ao estado Brasileiro de Santa Catarina) onde a população de *R. sanguineus* estudada possui alta competência vetorial (MORAES-FILHO, 2013).

A patogenia da erliquiose canina envolve um período de incubação de 8 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 o animal pode apresentar manifestações clínicas inespecíficas como letargia, anorexia, prostração, perda de peso, linfadenomegalia e hipertermia (HARRUS et al., 1997c; BORIN, et al., 2009).

Já na fase aguda, 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). Podem ser observados, ainda na fase aguda, petéquias e equimoses cutâneas e em mucosas, epistaxe, claudicação, mialgias e alterações oculares (uveíte, retinopatia e conjuntivite) (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 pode ser realizado com base na visualização de mórulas em células dos esfregaços de sangue periférico ou concentrado leucocitário, sorologia, cultura de microrganismos, imunoaglutinação e PCR (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008).

O diagnóstico molecular pode ser realizado a partir de material genético extraído de sangue total, medula óssea, linfonodos, soro e baço (HARRUS et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2009). Ramos e colaboradores (2009) utilizando a PCR e a pesquisa direta observaram 54% de positividade no teste molecular e 9% no parasitológico direto, sendo 4% desses considerados falsos positivos. Já, frente a testes sorológicos, a PCR se destaca por detectar o DNA do agente nos primeiros dias pós-infecção, antes mesmo de ocorrer a soroconversão (IQBAL et al., 1994; SUMMER et al., 1997; WEN et al., 1997), e por ser incomum a apresentação de resultados falsos positivos (NAKAGHI et al., 2008; HARRUS E WANER, 2011).

A primeira linha de tratamento é baseada no uso da doxiciclina, sendo a minociclina e a rifamicina consideradas segunda linha. Apesar destas terapêuticas apresentarem bons resultados na resolução dos sinais clínicos e alterações laboratoriais, nem sempre são efetivas na eliminação da infecção por *E. canis* (MYLONAKIS, 2019).

1.3.4 *Hepatozoon* spp.

A Hepatozoonose Canina é uma doença causada por protozoários do gênero *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) que parasitam monócitos e neutrófilos dos hospedeiros intermediários (BANETH et al., 2003). Os principais hospedeiros definitivos são os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma* spp., nos quais ocorre a esporogonia (BANETH, 2011). Os mamíferos são considerados hospedeiros intermediários e se infectam pela ingestão destes carrapatos contendo oocistos. Uma gama de artrópodes, como ácaros, carrapatos, piolhos e mosquitos podem atuar como hospedeiro definitivo para as diferentes espécies de *Hepatozoon* spp. (BANETH et al., 2003).

Até então, duas espécies de *Hepatozoon* foram identificadas em cães: *H. canis* e *H. americanum*. Esta classificação foi baseada principalmente nas características

genéticas, tropismo tecidual, achados morfológicos e patológicos, bem como nos sinais clínicos causados ao hospedeiro. O *H. canis* foi descrito na Europa, África, Ásia e América do Sul, enquanto o *H. americanum* é encontrado nos Estados Unidos da América (VINCENT-JOHNSON et al., 1997; BANETH et al., 2003).

Em 2005, através de técnicas moleculares, Rubini e colaboradores identificaram e caracterizaram espécies de *Hepatozoon* spp. em cães do estado de São Paulo como sendo *H. canis*. No mesmo ano, Paludo e colaboradores identificaram *H. canis* em cães em Brasília, e em 2007, Garcia de Sá e colaboradores identificaram a mesma espécie de *Hepatozoon* spp. em cães do Rio de Janeiro.

Ao contrário de muitas bactérias e protozoários transmitidos por carrapatos via glândulas salivares (BANETH, 2003), a transmissão do *H. canis* para o cão ocorre após a ingestão de carrapato contendo oocistos esporulados (GONDIM et al., 1998; PALUDO et al., 2003; ASSARASAKORN et al., 2006). Da mesma forma, o carrapato torna-se infectado ao ingerir sangue de um cão parasitado (BANETH, 2003).

Em relação à virulência do *H. canis*, acredita-se que seja fraca, pois infecções subclínicas são comuns, geralmente causando doença leve que pode afetar linfonodos, baço, medula óssea, resultando em letargia e anemia (BANETH e WEIGLER, 1997; BANETH, 2003).

A gravidade da doença causada pelo *H. canis* é influenciada por condições de infecções concorrentes, imunodeficiência e imaturidade do sistema imune. Coinfecções com *Ehrlichia* spp., *Toxoplasma gondii* ou *Babesia* spp. predisõem o aparecimento de manifestações clínicas (HARMELIN et al., 1992). Paludo et al (2005) sugerem que *H. canis* age como agente oportunista.

A PCR, ferramenta de diagnóstico específica e sensível para o *Hepatozoon* spp., detecta um número muito pequeno do DNA alvo, facilitando a detecção de alguns microrganismos abaixo do ponto inicial de detecção de culturas microbiológicas rotineiras de citologia, histologia ou imunohistoquímica (SELLON, 2003).

Ezeokoli et al. (1983) afirmavam que nenhuma terapia era efetiva contra a hepatozoonose, porém Voyvoda e colaboradores (2004) registraram eficácia positiva do uso do toltrazuril. O uso de dipropionato de imidocarb combinado com doxiciclina

ou tetraciclina também tiveram registros positivos no tratamento da doença (BANETH, 2003; GAVAZZA, 2003).

1.3.5 *Mycoplasma* spp.

A Micoplasmose Canina é uma doença de distribuição mundial causada por bactérias pequenas que infectam a parede de eritrócitos (NOVACCO et al., 2010). As espécies bacterianas mais comumente descritas em cães são *Mycoplasma haemocanis*, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasmas canis* e *M. cynos*, estando associadas à doenças respiratórias, anemia e infecções do trato urogenital (CHALKER, 2005).

A partir da classificação baseada na análise da sequência do gene 16S rRNA, a espécie *Haemobartonella canis* passou a ser denominada *Mycoplasma haemocanis*, deixando de pertencer a família Anaplasmataceae e integrando o gênero *Mycoplasma* (MESSICK et al., 2002). O *M. haemocanis* foi descrito pela primeira vez em 1928 (KIKUTH, 1928), desde então vários casos foram relatados (CARR e ESSEX, 1944; PRYOR e BRADBURY, 1975; BRISON e MESSICK, 2001).

O'dwyer et al. (1997) descreveram a presença de *Mycoplasma haemocanis* em esfregaços sanguíneos de cães em Belo Horizonte, região Sudeste do Brasil e, posteriormente, a bactéria foi caracterizada por PCR em quatro cães não esplenectomizados por De Moraes et al. (2003) em um Hospital Veterinário de Londrina no Paraná.

Apesar dos aspectos da transmissão natural ainda não estarem definitivamente estabelecidos, acredita-se que o *R. sanguineus*, seja o potencial vetor (NOVACCO et al., 2010) além de existirem evidências de possível transmissão transplacentária (KEMMING et al., 2004). Supõe-se que a infecção por *M. haemocanis* em cães não seja um evento raro, porém a maior parte dos infectados não apresenta manifestações

clínicas (NOVACCO et al., 2010) sendo que animais esplenectomizados, portadores de doença esplênica, sob ação de drogas imunossupressoras ou coinfectados com bactérias, vírus e outros hemoparasitos podem manifestar a enfermidade (KEMMING et al.,2004).

Os sinais clínicos da Micoplasmose Canina podem surgir entre 1 a 2 semanas após a infecção (PRYOR & BRADBURY, 1975) ou em um período de 4-9 semanas (KEMMING et al., 2004) incluindo anorexia, letargia, perda de peso e hipertermia, além de anemia hemolítica que em casos severos pode ser fatal (WEST, 1979).

A doença pode ocorrer de duas formas: a forma latente, que geralmente é assintomática e a forma aguda. Pode se observar anemia grave e leucopenia ou leucocitose. A trombocitopenia é uma alteração frequente em cães portadores de *M. haemocanis* e pode estar associada à distúrbios de coagulação (KEMMING et al.,2004).

O diagnóstico definitivo de pode ser realizado através de esfregaços de sangue periférico com coloração de Giemsa clássico, onde o *M. Haemocanis* é observado na forma de cocos (0,2-0,4 µm) na superfície do eritrócito, porém, hoje em dia a técnica mais eficaz de diagnóstico para identificar a presença de *M. haemocanis* é a PCR de sangue total (KEMMING et al.,2004).

O tratamento é realizado com a administração de tetraciclinas ou fluoroquinolonas. Esta terapia apresenta bons resultados em pacientes imunocompetentes, todavia em casos mais graves ou com resistência à esses antibióticos, pode-se utilizar enrofloxacina ou azitromicina (NELSON e COUTO, 2010).

1.3.6 *Rangelia vitalii*

O protozoário *R. vitalii* pertence a ordem Piroplasmorida e infecta eritrócitos, leucócitos e células endoteliais (LORETTI e BARROS, 2005).

A hipótese da existência de reservatórios silvestres de rangelirose é baseada em relatos, por esfregaço sanguíneo, de piroplasmas em canídeos das espécies graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) (RUAS et al., 2005) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon 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. *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *A. ovale* e *A. cajennense* são as espécies de carrapatos que foram encontradas parasitando caninos acometidos pela infecção por *R. vitalii* (CARINI; MACIEL, 1914b; BRAGA, 1935; LORETTI et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004; SOARES et al., 2011).

Um trabalho recente realizado por Soares (2014) relata 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*, *A. tigrinum*, *A. 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 *A. 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.

A distribuição da doença está associada a locais onde espécies de carrapatos capazes de infestar o cão estão presentes. No Rio Grande do Sul, um grande número de casos clínicos e necropsias com a presença de infecção por *R. vitalii* foram observados durante os meses de novembro a março, período em que a quantidade desses ectoparasitas no ambiente é grande (LORETTI et al., 2003)

Atualmente, o nambyuvú, também conhecido como febre amarela dos cães (CARINI, 1908) ou peste do sangue (PESTANA, 1910), é a principal causa de doença hemolítica em cães necropsiados na Mesorregião Centro Ocidental Rio-Grandense (FIGHERA et al., 2008).

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 (PESTANA, 1910b; CARINI; MACIEL, 1914; BRAGA, 1935).

Em relação às manifestações clínicas, podem ser observados: perda de peso, anorexia, hipertermia, dispneia, apatia, petéquias, desidratação, icterícia, mucosas hipocoradas, equimoses, hemorragias nasais, orais, anais e em borda de orelhas, além de linfadenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia (PESTANA, 1910; CARINI; MACIEL, 1914; LORETTI; BARROS, 2004 ; FIGHERA et al., 2010).

Conforme o significado da palavra “Nambyuvú” - orelha que sangra - sendo de origem Guarany, algo característico causado pela infecção por *R. vitalii*, é um sinal clínico correlacionado com o intenso consumo de plaquetas, pois este protozoário tem a capacidade de parasitar o endotélio vascular, lesando-o. Em casos de inoculação experimental, os animais não manifestam este tipo de sangramento constante nas orelhas sendo, provavelmente, necessária a picada de insetos ou lesões locais para o desenvolvimento do Nambyuvú (MOREIRA, 1939).

As lesões no endotélio vascular dos vasos que irrigam o sistema digestivo podem levar a alterações intestinais, bem como, a perda de sangue para o interior do lúmen intestinal. Assim, animais infectados naturalmente ou experimentalmente apresentam uma diarreia sanguinolenta inicialmente alaranjada, que posteriormente torna-se escura, muitas vezes com a presença de estrias de sangue, fazendo com que a doença também ficasse conhecida como Nambyuvú das tripas (PESTANA, 1910b; CARINI; MACIEL, 1914a).

As formas intraeritrocitárias de *R. vitalii* são morfologicamente muito similar ao piroplasma *Babesia canis vogeli*, que também infecta cães. Portanto, fazer um diagnóstico morfológico para diferenciação de espécies não é viável através do exame de esfregaço sanguíneo. A diferenciação dessas espécies é feita por diagnósticos moleculares por PCR com sondas específicas ou por sequenciamento genético. Trabalhos recentes têm se baseado em amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA ou da proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) (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 e fluidoterapia. A administração de corticóides tem

sido recomendada no tratamento da anemia hemolítica imunomediada idiopática ou secundária (BUCHELER et al., 1995).

1.3.7 *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. rhipicephallii* e *R. amblyommatis*); uma transmitida por pulgas do grupo TGR (*R. 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).

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* são os vetores da Febre Maculosa brasileira (FMB), sendo *A. sculptum* (antigo *A. cajennense*), *A. aureolatum* e *A. ovale* (vetor da *R. parkeri*) consideradas as espécies mais importantes na transmissão da doença (PINTER et al., 2016; MORAES-FILHO, 2017).

Em São Paulo, *A. sculptum* é considerado vetor no interior, enquanto *A. aureolatum* é responsável pela transmissão do patógeno na região metropolitana. Nesta mesma região, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* também tem sido considerado um possível vetor (LABRUNA, 2009; MOARES-FILHO, 2009).

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

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., 2009), e em locais endêmicos para a doença como o município de Mogi das Cruzes (EVANS et al., 2000).

Dois casos de Febre maculosa Brasileira em cães foram relatados por Labruna et al (2009). O diagnóstico foi fechado através de análise molecular e sorológica. Os cães apresentaram diarreia, êmese, hematoquesia, hipertermia, anorexia, letargia e alterações neurológicas (ataxia e nistagmo). A única alteração laboratorial relatada foi leucocitose em um dos animais e o tratamento de ambos foi realizado com Imizol® e doxiciclina (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 riquetsia através de histopatologia/imuno-histoquímica 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).

Os fármacos utilizados são as tetraciclinas, cloranfenicol ou doxiciclina, sendo este último mais efetivo, com menos reações adversas e assim, considerado de eleição no tratamento da enfermidade (BREITSCHERDT et al., 1999). A terapêutica precoce com a doxiciclina melhora o prognóstico dos cães, com uma resposta rápida em um a dois dias (RAOULT e PAROLA, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

As hemoparasitoses fazem parte das principais doenças transmissíveis dos cães domésticos, representando uma parcela importante da rotina dos clínicos veterinários. O diagnóstico sugestivo através de alterações laboratoriais como trombocitopenia e anemia somadas ao histórico de contato com o carrapato é, muitas vezes, o que direciona o tratamento.

O diagnóstico definitivo com a confirmação do patógeno muitas vezes não é realizada devido às questões financeiras, visto que a técnica de PCR gera custos relativamente altos para o tutor quando empregada de forma equivocada, com a solicitação de pesquisa de um número muito grande de patógenos. Porém, a detecção molecular da espécie envolvida na doença permite um direcionamento mais específico do tratamento, assim como um suporte maior para o médico veterinário nas questões de prognóstico e esclarecimento do tutor.

A fim de se realizar o direcionamento das solicitações de exames moleculares, é de extrema importância a pesquisa e o conhecimento dos patógenos envolvidos, assim como sua relação com os seus vetores, manifestações clínicas mais frequentes e as alterações laboratoriais mais encontradas.

O conhecimento dos patógenos mais frequentes na região estudada, assim como a associação com os vetores mais encontrados nesse tipo de ecossistema,

auxiliam no direcionamento do diagnóstico definitivo e, por fim, permitem uma terapêutica mais precisa e um prognóstico mais claro.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo a detecção molecular de hemoparasitos em sangue total de cães com trombocitopenia atendidos em hospital veterinário particular da Zona Norte de São Paulo, assim como relacionar possíveis manifestações clínicas e alterações laboratoriais.

3.2 Específicos

- Detectar a presença de DNA de *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Mycoplasma* spp., *Rangelia vitalii* e *Rickettsia rickettsii* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real e, de *Hepatozoon* spp. através da PCR convencional nas amostras de sangue total.
- Analisar a relação entre a infecção por hemoparasitos com as alterações plaquetárias, de hematócrito, número total de hemácias e leucócitos totais.

- Relacionar os resultados moleculares com as manifestações clínicas apresentadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e Período de realização

A coleta das amostras foi realizada em um hospital veterinário 24 horas particular da Zona norte de São Paulo no período de maio de 2018 a janeiro de 2019.

O delineamento amostral foi de conveniência, conforme a rotina do Hospital veterinário. Os pacientes foram oriundos de diferente áreas da zona norte, incluindo a região da serra da Cantareira, que possui vegetação típica de Mata Atlântica.

A Zona Norte corresponde à área do município de São Paulo situada ao norte do Rio Tietê, com exceção do distrito de Jaguara. Oficialmente é formada pelas subprefeituras das regiões Nordeste e Noroeste da capital (SÃO PAULO, 2002).

A Mata Atlântica cobria cerca de 82% da superfície do estado no início do processo de colonização (séculos XVI-XVII) (VICTOR et al., 1975). Porém, devido a sua substituição por diferentes utilizações, atualmente encontra-se reduzida a cerca de 17% do território (SÃO PAULO, 2010).

A cidade de São Paulo apresenta clima classificado como Tropical de Altitude, com índices pluviométricos elevados nos meses de verão e estiagem no inverno, sendo sua temperatura média do mês mais quente superior a 22°. (SÃO PAULO, 2017). Já a região da Serra da Cantareira classifica-se como Clima Tropical Úmido Serrano da Cantareira, onde as elevadas altitudes induzem um aumento nos totais pluviométricos e a temperatura média anual fica entre 17,7 e 19,3°C (TARIFA e AZEVEDO, 2001).

O processamento das amostras e realização das análises moleculares ocorreram no Laboratório de Doenças parasitárias da Universidade de São Paulo (USP), entre maio de 2018 e maio de 2019.

4.2 Coleta das amostras e exames laboratoriais

A amostragem utilizada foi de conveniência, sendo coletas 115 amostras de cães que apresentaram trombocitopenia no hemograma completo. O consentimento dos tutores foi obtido através da assinatura de termo escrito.

Os hemogramas foram solicitados pelos médicos veterinários no momento da consulta, com ou sem suspeita de hemoparasitoses. Foram realizados em analisador hematológico automático URIT 3000 VET PLUS - MHLab®. Foram realizadas as contagens de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e determinação da hemoglobina. O hematócrito foi determinado por meio da técnica de microhematócrito e a contagem diferencial de leucócitos (100 células) foi realizada nas extensões sanguíneas coradas, em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X).

Os pacientes foram considerados com trombocitopenia ao apresentarem valor total de plaquetas abaixo de 200 mil/ μ l de sangue, de acordo com os valores hematológicos de referência para cães de Meinkoth e Clinkenbeard (2000) - número total de plaquetas 200 – 500 mil/ μ l.

A coleta de sangue dos cães com trombocitopenia previamente diagnosticada foi realizada através de punção da veia jugular, com agulha de calibre 20x0,55 mm e seringa de 3 ml. Os volumes foram acondicionados em tubos estéreis com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e mantidos congelados em temperatura de -4°C até realizado do processo de extração do DNA.

Os dados, anamnese, exame físico e resultado de exames foram coletados da ficha clínica dos animais.

4.3 Extração de DNA

As amostras de sangue total foram processadas individualmente à extração de DNA, utilizando-se o “Kit de extração Purelink Genomic DNA Kit” (ThermoFisher Scientific®), conforme instruções do fabricante. Os eluatos obtidos de DNA foram devidamente identificados e armazenados a -20° C para posterior análise molecular.

4.4 PCR em tempo real

A PCR para *Anaplasma platys* foi realizada através da amplificação do gene 18s rRNA, com os primers An1-F e An2-R (Tabela 1), associados a uma sonda interna específica (6FAM-CGGATTTTTGTCGTAGCTTGCTATGATQSY) (KHATAT et al., 2017).

A PCR para *Babesia canis vogeli* foi realizada utilizando-se os primers senso hsp70-F e antisenso hsp70-R (Tabela 1) associados à uma sonda interna fluorogênica específica (5'- Hex/AGCGCCAGGCCACCAAGGACGCT-3'-IABIkFQ), obtendo-se a amplificação de um fragmento de 84 pares de base do gene hsp70 de *Babesia canis vogeli* (PELEG et al., 2010).

Para *E. canis*, a PCR foi realizada utilizando-se os primers Dsb-321 e Dsb-671 (Tabela 1), além da sonda específica TaqMan (5'- AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA - 3') 5' FAM/BHQ – 1 3', de acordo com DOYLE et al. (2005), obtendo-se uma sequência de nucleotídeos amplificados do gene *dsb*.

A detecção molecular de DNA de *Mycoplasma* spp. foi realizada utilizando-se os primers Hf-F e Hf Reverse (Tabela 1), além de Sondas Taqman específicas (6FAM-TGTGTTGCAAACCAGCGATGGT-QSY), conforme descritos por Tasker et al., 2003.

Os materiais obtidos da extração foram analisados para *R. vitalii* utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados senso Rv751-770 e antisenso Rv930-91 (Tabela 1), além de sonda TaqMan [5'- 6-FAM (CCT TAT CAA ATC ATT CTT C) MGB NFQ -3']. Este par de primers corresponde à amplificação de um fragmento de 179-pb do gene *hsp70* de *R. vitalii* (SOARES, 2014).

Para detecção de *Rickettsia rickettsii* através de PCR em tempo real, cada amostra de DNA extraído 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 (Tabela 1) 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.

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).

4.5 PCR convencional

Para a detecção de DNA de *Hepatozoon* spp., foram utilizados os primers HEP2 144-169 e HEP 2 743-718 (Tabela 1), que amplificam um fragmento de cerca de 574 pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp., conforme protocolo preconizado por Almeida et al. (2012).

O processo de desnaturação foi iniciado a 94°C durante 4 minutos, seguido por 40 ciclos: desnaturação a 90°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60s e extensão final a 72°C por 10 minutos. E então, a detecção do produto de amplificação foi realizada em gel de agarose 1%.

Tabela 1 – Primers utilizados para detecção de DNA de *A. Platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis*, *Hepatozoon* spp., *Mycoplasma* spp., *R. vitalii* e *R. rickettsii* através da técnica de PCR em tempo real e convencional em cães com trombocitopenia da Zona norte de São Paulo.

PATÓGENO	PRIMERS	GENE	SEQUÊNCIA	Referência
<i>A. platys</i> ¹	An1-F An2-R	18s rRNA	5'-CTCAGAACGAACACTGG-3' 5'-CATTCTAGTGGCTATCCC-3'	KHATAT et al., 2017
<i>B. canis vogeli</i> ¹	hsp70-F hsp70-R	<i>Hsp70</i>	5'-GTCATCACTGTGCCTGCGTACT-3' 5'-CATGACGTTGAGACCGGCAAT-3'	PELEG et al., 2010
<i>E. canis</i> ¹	Dsb-321 Dsb-671	<i>dsb</i>	5'- TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGA AACA-3' 5'- GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCC TA-3'	DOYLE et al., 2005
<i>Hepatozoon</i> spp. ²	HEP2 144-169 HEP 2 743-718	18S rRNA	5'- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC -3' 5'- ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG- 3'	ALMEIDA et al., 2012
<i>Mycoplasma</i> spp. ¹	Hf-F Hf-R		5'-GTGCTACAATGGGGAACACA- 3` 5'- TCCTATCCGAACTGAGACGAA - 3`	TASKER et al., 2003
<i>R. vitalii</i> ¹	Rv751- 770 Rv930- 911	<i>hsp 70</i>	5'- GCG TAT CCC GAA GAT TCA AA- 3` 5'- AGT GAA AGC GGT GCA ACA TC- 3`	SOARES, 2014
<i>R. rickettsii</i> ¹	Citrato sintase	CS5 CS6	5` GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGA T3` 5'AGGGTCTTCGTGCATTTCTT3'	LABRUNA, 2004

¹ PCR em tempo real; ² PCR convencional.

4.6 Cálculo Estatístico

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o método dos quadrados mínimos empregando-se o procedimento PROC GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2001) onde foi avaliado o efeito dos resultados da pesquisa molecular de hemoparasitos, sobre os valores de leucócitos, plaquetas e hematócrito, além da presença de hipertermia, perda de peso, hematúria, icterícia, hemorragias, apatia, mucosas hipocoradas, linfadenopatias, sinais gastrointestinais, neurológicos, locomotores, respiratórios, desidratação, epistaxe e ótibo. Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados e na análise de variância, quando observou efeito significativo, foi realizada comparação das médias pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras

Foram selecionadas 115 amostras de sangue total de cães atendidos no hospital veterinário, sendo 58 machos e 57 fêmeas. As idades dos indivíduos variaram entre 9 meses e 18 anos.

5.2 PCR em tempo real e PCR convencional

Quarenta e três amostras (37,39%) foram positivas na PCR para pelo menos um agente patogênico. Destas, 28 foram positivas para um único agente: 13 para *Hepatozoon* spp.; 7 para *Ehrlichia canis*; 7 para *Babesia canis vogeli* e 1 para *Anaplasma platys*. As outras 15 amostras tiveram material genético de mais de um hemoparasito detectado: 9 de *Babesia canis vogeli* com *Hepatozoon* spp.; 2 de *Ehrlichia canis* com *Hepatozoon* spp; 2 de *B. canis vogeli* com *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii*; e mais 2 casos de coinfeções distintas – *A. platys* associada com *B. canis vogeli*, *E. canis* e *Mycoplasma* spp.; *B. canis vogeli* com *Hepatozoon* spp. e *Mycoplasma* spp.. Nenhuma amostra foi positiva para *Rickettsia rickettsii* (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência de infecções por hemoparasitos em amostras de sangue de cães com trombocitopenia da Zona Norte de São Paulo detectadas por PCR em tempo real e convencional.

PATÓGENO	CÃES (N=115)
<i>Anaplasma platys</i> ¹ (Infecção única)	1(0,86%)
<i>Ehrlichia canis</i> ¹ (Infecção única)	7 (6,08%)
<i>Babesia canis vogeli</i> ¹ (Infecção única)	7(6,08%)
<i>Hepatozoon</i> spp. ² (Infecção única)	13 (11,30%)
<i>Mycoplasma</i> spp. ¹ (Infecção única)	0
<i>Rangelia vitalii</i> ¹ (Infecção única)	0
<i>Rickettsia rickettsii</i> ¹ (Infecção única)	0
<i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ²	9 (7,82%)
<i>E. canis</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ²	2 (1,62%)
<i>A. platys</i> ¹ + <i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>E. canis</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ²	1(0,86%)
<i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ² + <i>Mycoplasma</i> spp. ¹	1 (0,86%)
<i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ² + <i>R. vitalii</i> ¹	2 (1,62%)
Total de cães infectados	43 (37,3913%)

¹PCR em tempo real; ² PCR convencional.

5.3 Manifestações clínicas

Através da análise da ficha clínica dos 115 cães, foram registradas manifestações clínicas diversas como sinais gastrointestinais (47,82%), apatia (38,26%), mucosas hipocoradas (17,39%), hipertermia (16,52%), perda de peso (13,91%), sinais neurológicos (13,15%), hematúria (12,17%), alterações locomotoras

(10,43%), respiratórias (9,56%), desidratação (8,69%), linfadenopatias (4,34%), hemorragias (3,47%), icterícia (2,6%), epistaxe (0,86%) e óbito (10,43%).

As 72 amostras negativas na PCR corresponderam a pacientes que apresentaram sinais gastrointestinais (40,28%); apatia (27,78%); mucosas hipocoradas (18,06%); hipertermia e sinais neurológicos (12,5%); sinais locomotores e óbito (8,33%); sinais respiratórios e perda de peso (6,94%); hematúria (5,56%); desidratação e linfadenopatias (2,78%); icterícia e hemorragias (1,39%).

O animal que apresentou resultado positivo na PCR para *A. platys* (infecção única) apresentou hipertermia, sinais respiratórios, desidratação e acabou evoluindo para óbito (Tabelas 3 e 4).

Dos 7 animais positivos para *B. canis vogeli*, manifestações gastrointestinais e desidratação foram observados em 42,86% das amostras; apatia, perda de peso, hematúria e sinais neurológicos foram registrados com uma frequência de 28,57%, enquanto linfadenopatia, hipertermia, mucosas hipocoradas, sinais respiratórios e óbito foram observados com 14,29% de ocorrência (Tabelas 3 e 4).

Os pacientes positivos para *E. canis* apresentaram apatia (71,43%); perda de peso (57,14%); sinais gastrointestinais, neurológicos e hematúria (42,86%); sinais respiratórios, locomotores, hemorragias, mucosas hipocoradas, desidratação e hipertermia (14,29%) (Tabelas 3 e 4).

Nos casos de infecção única por *Hepatozoon* spp. foram observados sinais gastrointestinais (76,92%); apatia (61,54%); desidratação, mucosas hipocoradas e óbito (23,08%); hematúria e perda de peso (15,38%); hipertermia (7,69%); hemorragias e sinais respiratórios (7,6%) (Tabelas 3 e 4).

As coinfeções por *B. canis vogeli* e *Hepatozoon* spp. registraram sinais gastrointestinais (77,78%); apatia (66,67%); hipertermia (44,44%); sinais respiratórios, perda de peso, hematúria, sinais locomotores e óbito (22,22%); mucosas hipocoradas, manifestações neurológicas, icterícia e desidratação (11,11%) (Tabelas 3 e 4).

Os dois pacientes correspondentes às amostras positivas para infecções mistas por *E. canis* e *Hepatozoon* spp. estavam apáticos e com hipocoloração das

mucosas. Além disso, um deles apresentou icterícia, hemorragias, sinais gastrointestinais, linfadenopatia e sinais locomotores (Tabelas 3 e 4).

A coinfeção por *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis* e *Hepatozoon* spp. ocorreu em um paciente que apresentava hipertermia, apatia e sintomatologia locomotora. O animal positivo para *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *Mycoplasma* spp. foi atendido com sinais gastrointestinais e hipertermia, enquanto a infecção mista por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* foi registrada em 2 animais com sintomatologia locomotora, respiratória, gastrointestinal, hematúria, linfadenopatia, hipertermia, perda de peso e epistaxe (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Manifestações clínicas de cães com trombocitopenia, da Zona norte de São Paulo, positivos para hemoparasitos na PCR em tempo real e convencional.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
<i>A. platys</i> ¹ (Infecção única)	Hipertermia, sinais respiratórios, desidratação, óbito
<i>B. canis vogeli</i> ¹ (Infecção única)	Sinais gastrointestinais, perda de peso, apatia, desidratação, hematúria, sinais neurológicos, mucosas hipocoradas, linfadenopatia
<i>E. canis</i> ¹ (Infecção única)	Apatia, perda de peso, hematúria, hemorragias, mucosas hipocoradas, desidratação, hipertermia, sinais gastrointestinais, neurológicos, respiratórios e locomotores
<i>Hepatozoon</i> spp. ² (Infecção única)	Apatia, desidratação, hipertermia, hematúria, perda de peso, hemorragias, mucosas hipocoradas, sinais gastrointestinais, respiratório, óbito
<i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ²	Apatia, hipertermia, perda de peso, hematúria, icterícia, mucosas hipocoradas, desidratação, sinais gastrointestinais, respiratórios, locomotores, neurológicos, óbito
<i>E. canis</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ²	Apatia, hemorragias, icterícia, mucosas hipocoradas, linfadenopatia, sinais gastrointestinais e locomotores
<i>A. platys</i> ¹ + <i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>E. canis</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ²	Apatia, hipertermia, sinais locomotores
<i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ² + <i>Mycoplasma</i> spp. ¹	Hipertermia, sinais gastrointestinais
<i>B. canis vogeli</i> ¹ + <i>Hepatozoon</i> spp. ² + <i>R. vitalii</i> ¹	Hipertermia, perda de peso, hematúria, linfadenopatia, epistaxe, sinais locomotores, gastrointestinais e respiratórios

¹PCR em tempo real; ² PCR convencional.

5.4 Resultados hematológicos

5.4.1 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 115 amostras analisadas, 33 apresentaram anemia (29,20%), sendo 12 (10,61%) classificadas como leves; 16 (14,15%) moderadas; 3 (2,65%) severas e 2 (1,76%) muito severas. A média de hematócrito dos pacientes negativos na PCR foi de 44,306%.

O paciente positivo na PCR para *A. platys* apresentou hematócrito de 42%. Os valores dos positivos para *B. canis vogeli* variaram entre 27 e 56%, com uma média de 43,42%. O menor valor entre os animais positivos para *E. canis* foi de 31% e o maior de 52%, com uma média de 42,42%. E entre os casos de coinfeção de *E. canis* com *Hepatozoon* spp., os hematócritos variaram entre 25 e 39%, com média de 32% (anemia leve).

Entre as amostras positivas para *Hepatozoon* spp. registrou-se um valor mínimo de 14% e máximo de 56%, com um valor médio de 34,69% (anemia leve). Já nas coinfeções por *B. canis vogeli* e *Hepatozoon* spp. o menor valor de hematócrito foi 23% e o maior 58%, sendo 47,33% a média.

O animal com infecção mista por *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis* e *Hepatozoon* spp. apresentou hematócrito de 44%. Na coinfeção por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *Mycoplasma* spp. registrou-se 55%, enquanto que entre os

hemogramas dos pacientes coinfectados por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* observou-se hematócrito médio de 32,5% (anemia leve).

Os valores médios de hematócrito, mediana e desvio padrão estão demonstrados nas tabelas 4.

5.4.2 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 115 amostras foi de 3400/ μ l e o mais alto de 83500/ μ l. Onze (9,64%) apresentaram leucopenia, enquanto que em 31 amostras (27,43%) observou-se leucocitose. A média do número total de leucócitos dos pacientes negativos da PCR foi de 24301/ μ l.

O valor total de leucócitos do paciente positivo para *A. platys* foi de 12300/ μ l de sangue. As amostras positivas para *B. canis vogeli* registraram valores entre 5800 e 35200/ μ l, com uma média de 7800/ μ l. Já os pacientes com PCR positiva para *E. canis* demonstraram valor mínimo de 4000 e máximo de 35200/ μ l, com 15778/ μ l como valor médio.

O número total de leucócitos dos animais infectados por *Hepatozoon* spp. variou entre 8100 e 83800/ μ l, com valor médio de 24301/ μ l de sangue. Já nas coinfeções por *B. canis vogeli* e *Hepatozoon* spp. o menor valor de leucócitos totais foi 9800/ μ l e o maior 21100/ μ l, sendo 15778/ μ l a média, enquanto que nas amostras coinfectadas por *E. canis* e *Hepatozoon* spp. registrou-se valor médio de 36450/ μ l.

O animal com infecção mista por *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis* e *Hepatozoon* spp. apresentou valor total de leucócitos de 12600/ μ l. Na coinfeção por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *Mycoplasma* spp. registrou-se 11300/ μ l, enquanto que nos leucogramas dos pacientes coinfectados por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* observou-se valor médio de 18150/ μ l de sangue.

Os valores médios de leucócitos totais assim como as medianas e valores de desvio padrão estão demonstrados nas tabela 4.

5.4.3 Número total de plaquetas

O menor número total de plaquetas entre as 115 amostras trombocitopênicas do estudo foi de 24 mil/ μl e o maior de 199999/ μl . O valor médio das amostras negativas no PCR foi de 143507/ μl .

O número total de plaquetas do paciente positivo para *A. platys* foi de 60 mil/ μl de sangue. As amostras positivas para *B. canis vogeli* registraram valores entre 27000 e 198000/ μl , com uma média de 84429/ μl . Já os pacientes com PCR positiva para *E. canis* demonstraram valor mínimo de 24000 e máximo de 180000/ μl , com 117571/ μl como valor médio.

Os valores dos animais infectados por *Hepatozoon* spp. variaram entre 40000 e 194000/ μl , com valor médio de 125385/ μl de sangue. Já nas coinfeções por *B. canis vogeli* e *Hepatozoon* spp. o menor valor total de plaquetas foi 52000/ μl e o maior 176000/ μl , sendo 124000/ μl a média, enquanto que nas amostras coinfectadas por *E. canis* com *Hepatozoon* spp. registraram valor médio de 136000/ μl .

O animal com infecção mista por *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis* e *Hepatozoon* spp. apresentou valor total de plaquetas de 67000/ μl . Na coinfeção por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *Mycoplasma* spp. registrou-se 118000/ μl , enquanto que nos hemogramas dos pacientes coinfectados por *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* observou-se valor médio de 80000 plaquetas/ μl de sangue.

Os valores médios de plaquetas assim como as medianas e valores de desvio de padrão estão demonstrados nas tabela 4.

5.4.4 Análises Estatísticas

A partir das análises estatísticas dos parâmetros analisados apresentados na tabela 4, pode-se verificar que, de fato, há uma diferença entre os valores de hipertermia, com um valor de p igual a 0,0016; de icterícia, com um valor de p igual a 0,0023; de linfadenopatias, com um valor de p igual a 0,0009; de sinais locomotores, com um valor de p igual a 0,0058; de epistaxe, com um valor de $p \leq 0,0001$ entre as amostras pesquisadas.

Com relação aos valores dos outros parâmetros de hemograma e sintomatologia clínica, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais pesquisados.

Tabela 4 – Diagnóstico molecular, manifestações clínicas e alterações laboratoriais em cães com trombocitopenia da Zona norte de São Paulo

	Negativos (72)	<i>Hepatozoon</i> spp. (13)	<i>E. canis</i> (7)	<i>B. canis vogeli</i> (7)	<i>B.c.v.</i> + <i>R.v.</i> + <i>H.</i> (1)	<i>B.c.v.</i> + <i>H.</i> + <i>M.</i> (1)	<i>B.c.v.</i> + <i>H.</i> (9)	<i>B.c.v.</i> + <i>A.p.</i> + <i>E.c.</i> + <i>H.</i> (1)	<i>A. platys</i> (1)	<i>p</i> *
Leucócitos (/µl)	24301 ^a	21709 ^a	15343 ^a	7800 ^a	18150 ^a	11300 ^a	15778 ^a	12600 ^a	12300 ^a	<i>p</i> = 0,8853
Plaquetas (/µl)	143507 ^a	125385 ^a	136000 ^a	84429 ^a	80000 ^a	118000 ^a	124000 ^a	67000 ^a	60000 ^a	<i>p</i> = 0,0261
Hematócrito (%)	44,306 ^a	34,692 ^a	32 ^a	43,429 ^a	32,5 ^a	55 ^a	47,333 ^a	44 ^a	42 ^a	<i>p</i> = 0,1726
Hipertermia (%)	12,5 ^b	7,69 ^b	0 ^b	14,29 ^b	100 ^a	100 ^a	44,44 ^{ab}	100 ^a	100 ^a	<i>p</i> = 0,0016
Perda de peso (%)	6,94 ^a	15,38 ^a	0 ^a	28,57 ^a	50 ^a	0 ^a	22,22 ^a	0 ^a	0 ^a	<i>p</i> = 0,0093
Hematúria (%)	5,56 ^a	15,38 ^a	0 ^a	28,57 ^a	50 ^a	0 ^a	22,22 ^a	0 ^a	0 ^a	<i>p</i> = 0,0361
Icterícia (%)	1,39 ^b	0 ^b	50 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	11,11 ^b	0 ^b	0 ^b	<i>p</i> = 0,0023
Hemorragias (%)	1,39 ^b	7,60 ^{ab}	50 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	<i>p</i> = 0,0124
Apatia (%)	27,78 ^a	61,54 ^a	100 ^a	28,57 ^a	0 ^a	0 ^a	66,67 ^a	100 ^a	0 ^a	<i>p</i> = 0,0064
Mucosas hipocoradas (%)	18,06 ^a	23,08 ^a	50 ^a	14,29 ^a	0 ^a	0 ^a	11,11 ^a	0 ^a	0 ^a	<i>p</i> = 0,9177
Linfadenopatias (%)	2,78 ^b	0 ^b	50 ^a	14,29 ^{ab}	50 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	<i>p</i> = 0,0009
S. Gastro. (%)	40,28 ^a	76,92 ^a	50 ^a	42,86 ^a	100 ^a	100 ^a	77,78 ^a	0 ^a	0 ^a	<i>p</i> = 0,0830
S. Neuro. (%)	12,5 ^a	0 ^a	0 ^a	42,86 ^a	0 ^a	0 ^a	11,11 ^a	0 ^a	0 ^a	<i>p</i> = 0,2179
S. Loco. (%)	8,33 ^b	0 ^b	50 ^{ab}	14,29 ^b	50 ^{ab}	0 ^b	22,22 ^b	100 ^a	0 ^b	<i>p</i> = 0,0058
S. Resp. (%)	6,94 ^a	7,69 ^a	0 ^a	14,29 ^a	50 ^a	0 ^a	22,22 ^a	0 ^a	100 ^a	<i>p</i> = 0,4817
Desidratação (%)	2,78 ^a	23,08 ^a	0 ^a	14,29 ^a	0 ^a	0 ^a	11,11 ^a	0 ^a	100 ^a	<i>p</i> = 0,0122
Epistaxe (%)	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	50 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	<i>p</i> = <.0001
Óbito (%)	8,33 ^a	23,08 ^a	0 ^a	14,29 ^a	0 ^a	0 ^a	22,22 ^a	0 ^a	100 ^a	<i>p</i> = 0,6373

E.c. - *E. canis*; *H.* - *Hepatozoon* spp.; *B.c.v.* - *B. canis vogeli*; *R.v.* - *R. vitalii*; *M.* - *Mycoplasma* spp.; *A.p.* - *A. platys*; *S.* - Sinais; Gastro. - gastrointestinais; Neuro. - neurológicos; Loco. - locomotores; Resp. - respiratórios. * Valor de *p* considerado significativo abaixo de 0,05. Valores com letras iguais (a/b) não são estatisticamente diferentes.

6 DISCUSSÃO

As doenças transmitidas por carrapatos representam parcela importante da clínica médica humana e veterinária do mundo todo, com um ciclo envolvendo vertebrados e invertebrados interagindo em biomas em constantes mudanças (DANTAS-TORRES, 2008). A cidade de São Paulo é caracterizada por variações do clima tropical, com presença de fragmentos de Mata Atlântica, inclusive na Zona Norte (SÃO PAULO, 2010; 2017), origem das amostras dos pacientes do presente estudo. Apesar deste bioma possuir condições climáticas propícias para o desenvolvimento de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. (PINTER et al., 2004, SCINACHI et al., 2017) apenas duas amostras (1,62%) foram positivas para *R. vitalii* (coinfecção) e nenhuma apresentou material genético de *R. rickettsii*.

Das 115 amostras analisadas, 43 (37,39%) foram positivas para ao menos um patógeno. Na última década, pesquisas moleculares em locais distintos do Brasil relataram dados diferentes: Na cidade de Recife, *A. platys*, *E. canis*, *B. canis vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *M. haemocanis*, registraram frequência de amostras positivas de 69,26% (N=205) (RAMOS et al., 2010). No estado de Minas Gerais, a análise molecular para *E. canis*, *A. platys*, *Leishmania infantum/chagasi* e *Babesia* spp., demonstrou uma frequência de 55,9% de positivos em um número de 93 cães (VALENTE, 2014). No Maranhão, houve baixa frequência de positivos para *B. vogeli*, *E. canis* e *Rickettsia* spp. (3,7%) na PCR de 322 amostras (COSTA et al., 2015). Já na cidade de Passo Fundo/RS a frequência de infecções foi de 17,3% em pesquisa molecular de *R. vitalii*, *B. vogeli*, *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. realizada com amostras de sangue de 110 cães (MALHEIROS et al., 2016) e de 6,8% em outro estudo realizado com 58 cães e pesquisa de *R. vitalii*, *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. (GOTTLIEB et al., 2016).

A PCR detectou DNA de *Hepatozoon* spp. (11,3%), *B. canis vogeli* (6,08%), *E. canis* (6,08%), *A. platys* (0,86%) e coinfeções envolvendo, além desses patógenos, *Mycoplasma* spp. Todos estão relacionados com o carrapato *R. sanguineus*, o qual, com hábitos nidícolas e domicílios urbanos como habitat (LABRUNA, 2004), encontra

na grande área urbana da região metropolitana de São Paulo e, no grande número de cães domésticos, condições ideais para sua manutenção e transmissão dos patógenos.

De acordo com Otranto et al. (2009), a presença de infecções mistas de hemoparasitos são frequentes em áreas endêmicas e podem estar relacionada com a possibilidade de um vetor ser o responsável pela transmissão de mais de um agente. No presente estudo, 14 das 115 amostras (12,17%) apresentaram 2, 3 ou 4 agentes em coinfeções. Valente (2014) relatou uma taxa de 36,5% de coinfeções em seu estudo, enquanto Ramos e colaboradores (2010) registraram 23,9% das amostras com material genético de mais de um hemoparasito (VALENTE, 2014; RAMOS et al., 2010).

Em relação às anormalidades leucocitárias, considerando-se o valor médio, houve leucocitose entre os pacientes com PCR negativa (24301/ μ l) e entre as amostras positivas para *Hepatozoon* spp. (21709/ μ l). Diminuição e aumento na contagem de leucócitos já foram anteriormente descritos em tempos diferentes após o início da infecção (FURLANELLO et al., 2005; LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010). Contudo, não houve diferença estatística entre os valores de leucócitos totais ($p=0,88$).

Anemia secundária à desordens intra ou extravasculares é, juntamente com a trombocitopenia, a alteração laboratorial mais frequente em casos de hemoparasitoses (PADDOCK e CHILDS, 2003; FIGHERA, 2007; PAIM et al., 2012), e a mais encontrada em infecções por *Babesia* sp. e *Rangelia vitalii* (FIGHERA et al., 2010; FURLANELLO et al., 2005). No presente estudo, apesar de ocorrer anemia leve entre os animais positivos para *Hepatozoon* spp. (Ht=34,69%), *E. canis* com *Hepatozoon* spp. (Ht=32%) e *B. canis vogeli* com *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* (Ht=32,5%), este parâmetro não foi estatisticamente importante. Diferente disso, um estudo realizado no Rio Grande do Sul encontrou hematócrito reduzido em 48,2% de 58 cães positivos para *R. vitalii* na PCR e para *E. canis* e *Babesia* spp. na sorologia (GOLTLIEB et al., 2016).

6.1 Infecção por *Anaplasma platys*

Apenas uma amostra (0,86%) foi positiva para *Anaplasma platys* como infecção única. A porcentagem de infectados por esse hemoparasito foi maior (4,5%) em pesquisa molecular e avaliação de alterações oculares realizada em 200 cães de Goiânia/GO, porém todas os positivos corresponderam a casos de coinfeções com *E. canis* (COSTA, 2015). Já no estado de Minas Gerais, 21,2% de 93 cães estavam infectados apenas por *A. platys* (VALENTE, 2014). No Rio Grande do Sul, a detecção deste patógeno é descrita em estudo de Lasta e colaboradores (2013) os quais encontravam 14,07% de cães positivos no PCR porém, em 2016, em outro estudo de pesquisa de hemoparasitos em cães do mesmo estado, registrou-se frequência de apenas 1% (LASTA et al., 2013; MALHEIROS et al., 2016).

Manifestações clínicas em cães afetados unicamente por Anaplasmosose são raras (BREITSCHWERDT et al., 1997). No presente estudo, o cão positivo apresentava hipertermia, sinais respiratórios e desidratação, além de acabar evoluindo para o óbito. Contudo, o paciente era portador de cardiopatia e não se tem dados suficientes, como outros exames complementares, para a afirmação de que o agravamento de estado de saúde do paciente seja devido à hemoparasitose.

Assim como em nosso trabalho, grande parte das pesquisas publicadas remetem à números pequenos de amostras positivas para *A. platys*. Ao contrário disso, um trabalho realizado com 182 cães não domiciliados da cidade de Pato Branco no Paraná, demonstrou uma taxa de 32,9% de cães infectados por *A. platys*, além de infecções mistas com *B. canis vogeli* (3,8%) e nenhuma amostra positiva para *E. canis* (RIBEIRO et al., 2017).

6.2 Infecção por *Babesia canis vogeli*

Os resultados obtidos neste trabalho na PCR para *Babesia canis vogeli* foram de 6,08% de amostras com infecção única. A porcentagem de infectados encontrada é próxima à de 4,8% registrada por Silva e colaboradores (2015) em 146 cães de hospital veterinário, divergindo de estudo realizado anteriormente pelos mesmos autores porém com 300 cães apresentando menor ocorrência de sintomatologia clínica, onde a frequência foi de 3,3% (SILVA et al., 2012; 2015).

Já no estado de São Paulo, registrou-se taxa de infecção de *Babesia* spp. de 8% em cães do interior (O'DWYER et al., 2009), enquanto que em Londrina/PR foi encontrada uma frequência alta de infecção por esse agente (37,2%) em um número de 282 amostras (JOJIMA et al., 2008). Outro estudo detectou 7,31% de amostras positivas para *B. canis vogeli* em cães de Pernambuco (RAMOS et al., 2010) e, na região sudoeste do Paraná, em pesquisa realizada com 182 cães não domiciliados, 10,9% foram positivos para este patógeno. No mesmo estado, em Guarapuava, apenas um cão foi positivo para *B. vogeli* (1,33%) (MONGRUEL et al., 2018).

No presente estudo ocorreram casos de coinfeção de *B. canis vogeli* (11,16%) com: *Hepatozoon* spp. (7,82%); *Mycoplasma* spp e *Hepatozoon* spp. (0,86%); *A. platys*, *E. canis* e *Hepatozoon* spp. (0,86%); e *Hepatozoon* spp. e *R. vitalii* (1,62%). No Paraná, registrou-se 3,8% de coinfeção deste hemoparasito com *A. platys* (MONGRUEL et al., 2018), enquanto que no Recife, foram encontradas coinfeções de *B. canis vogeli* com *A. platys* (7,31%); *E. canis* (38,04%); *A. platys* e *E. canis* (0,48%).

As manifestações clínicas observadas nos pacientes positivos para *B. canis vogeli* foram sinais gastrointestinais, perda de peso, apatia, desidratação, hematúria, sinais neurológicos, mucosas hipocoradas e linfadenopatia, sinais citados como característicos de Babesiose canina, principalmente na fase hiperaguda (VIDOTTO e TRAPP, 2004; FURLANELLO et al., 2005; DANTASTORRES e FIGUEIREDO, 2006). Os animais estudados por Silva e colaboradores apresentaram hipertermia, sinais gastrointestinais, palidez de mucosas, icterícia, hematúria, desidratação e perda de

peso (SILVA et al., 2015). A amostra positiva para *B. canis vogeli* em Guarapuava correspondia a um paciente apenas com linfadenopatia como alteração clínica (MONGRUEL et al., 2018).

A anemia normocítica normocrômica ocorre nos primeiros dias da infecção, quando há hemólise aguda (FURLANELLO et al., 2005; LOPES et al., 2007; BIRKERHEUER, 2012). Os animais positivos apenas para *B. canis vogeli* apresentaram valor médio de hematócrito de 43,42%, sendo encontrada apenas anemia leve (Ht médio de 32,5%) no grupo de coinfectados com *R. vitalii* e *Hepatozoon* spp. Em pesquisa realizada por Jojima et al. (2008), dos cães positivos para *Babesia* spp., 3,9% apresentaram anemia, leucopenia e trombocitopenia.

Outro estudo, realizado com cães diagnosticados com Babesiose através da visualização de trofozoítos de *Babesia* sp., 70,37% dos casos apresentaram anemia. No leucograma desses cães foi observada leucopenia em 51,85% e leucocitose em 7,41% (CANUTO et al., 2016). As alterações leucocitárias são inespecíficas, podendo o hemograma apresentar leucocitose com neutrofilia em doença hiperaguda, leucopenia, neutrofilia ou neutropenia, linfocitose e eosinofilia e monocitose (VERCAMMEN et al., 1997). No presente estudo, o valor médio do número total de leucócitos dos cães com infecção única por esse protozoário estava dentro dos valores de referência (7800/ μ l), ocorrendo leucocitose na coinfecção com *R. vitalii* e *Hepatozoon* spp. (18150/ μ l).

6.3 Infecção por *Ehrlichia canis*

A PCR em tempo real para *E. canis* foi positiva, como infecção única, em 7 amostras (6,14%). No Maranhão, apenas 9 cães de 322 (2,8%) foram positivos para esse hemoparasito (COSTA et al., 2015), valores baixos como os que Rotondano e colaboradores encontraram em amostragem aleatória de 719 cães saudáveis no estado da Paraíba (8,9%) (ROTONDANO et al., 2017), discrepando com estudo

realizado anos antes pelos mesmos pesquisadores, porém com cães oriundos do atendimento de um Hospital veterinário, onde a porcentagem de amostras positivas para *E. canis* foi equivalente a 25% (N=100) (ROTONDANO et al., 2015).

Manifestações clínicas como mucosas hipocoradas, hiporexia a anorexia (perda de peso), apatia e sinais gastrointestinais, relacionada a EMC (NEER et al., 2002; FRANK e BREITSCHEWEDT, 1999) foram observadas em todos os animais positivos para *E. canis*. A palidez de mucosas, encontrada em 14,29% dos positivos, pode ser devido a anemia secundária aos sangramentos espontâneos que podem ocorrer devido à trombocitopenia (FRANK e BREITSCHEWEDT, 1999; HARRUS et al., 1997a) e também devido à anorexia, anemia de doença crônica e supressão das atividades eritropoieticas (HUXSOLL et al., 1970; WANER e HARRUS, 2000).

Contudo, o valor médio de hematócrito das amostras com DNA de *E. canis* foi de 42,42% - dentro dos valores normais de referência - assim como o número total de leucócitos (15778/ μ l), resultado diferente do encontrado por Manoel (2010), onde grande parte dos cães apresentaram quadros de leucopenia. A leucopenia raramente é citada na fase aguda da doença, sendo observada frequentemente em estágios terminais (HASEGAWA, 2005).

Hemorragias espontâneas foram observadas em 14,29% dos cães infectados por *E. canis*, essa alteração pode ocorrer devido à intensa vasculite e distúrbios na hemostasia primária (HARRUS et al., 1997b), sendo observada em 19,6% das amostras em estudo realizado, também na cidade de São Paulo, com 82 cães diagnosticados por PCR (MANOEL, 2010).

O hemoparasito *Ehrlichia canis* foi detectado em coinfeções com *Hepatozoon* spp. (1,62%) e, *A. platys*, *B. canis vogeli* e *Hepatozoon* spp. (0,86%). Valente (2014) registrou coinfeções com *A. platys* (47,4%), além de *L. infantum/chagasi* (10,5%), *Babesia* spp. (10,4%) e diferentes associações entre os 3 patógenos (VALENTE, 2014). Entre outras infecções mistas, foi encontrada infecção por *E. canis* associada a *Hepatozoon canis* e *A. platys* em 1 amostra entre 205 (0,48%) pesquisadas em Recife (RAMOS et al., 2010). Coinfeções entre *A. platys* e *E. canis* também foram reportadas em Ribeirão Preto/SP (SANTOS et al., 2009) e em Cuiabá/MT (SOUSA et al., 2009).

6.4 Infecção por *Hepatozoon spp.*

Treze das 115 amostras analisadas (11,3%) foram positivas unicamente para *Hepatozoon spp.*, porém este patógeno foi encontrado em infecções mistas com: *B. canis vogeli* (7,82%); *E. canis* (1,62%); *A. platys*, *B. canis vogeli* e *E. canis* (0,86%); *B. canis vogeli* e *Mycoplasma spp.* (0,86%); *B. canis vogeli* e *R. vitalii* (1,62%). No Rio Grande do Sul, a frequência de infecção por este patógeno foi baixa (1%) (MALHEIROS et al., 2106), dado semelhante ao encontrado no Paraná, onde apenas uma amostra (1,33%) foi encontrada infectada por *Hepatozoon spp.* (MONGRUEL et al., 2018).

No estado de Minas Gerais, em um estudo realizado com diagnóstico através da visualização do patógeno em esfregaços sanguíneos, houve frequência de 1,6% de amostras positivas (SILVA et al., 2014). Através do mesmo método diagnóstico, O'dwyer e colaboradores encontraram 39,2% de amostras positivas em 250 cães da área rural do Rio de Janeiro, sendo descritas coinfeções com *E. canis* e *B. vogeli*. Os mesmo autores relataram 5,9% de esfregaços com inclusões compatíveis com *Hepatozoon spp.* em 222 cães naturalmente infectados da cidade de São Paulo (O'dwyer et al., 2001; 2004).

Entre os 43 cães que foram diagnosticados com pelo menos um patógeno circulante neste trabalho, 28 foram positivos para *Hepatozoon spp.* (65%). Grande parte dos trabalhos relata a hepatozoonose em animais procedentes de áreas rurais (O'DWYER et al., 2001; RUBINI et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2009). Este fato pode ser atribuído à maior locomoção dos cães de áreas rurais possibilitando maior contato com outros animais e com maior número de espécies veiculadoras do protozoário, além da provável infestação por carrapatos do meio rural, como os do gênero *Amblyomma*, vetores reconhecidos de *Hepatozoon spp.* no Brasil (FORLANO et al., 2005).

Em estudo realizado no Rio de Janeiro, quatro tipos de carrapatos foram encontrados parasitando os cães estudados: *A. cajennense* (atual *A. sculptum*) (23,6%), *R. sanguineus* (12,4%), *A. aureolatum* (2,8%) e *A. ovale* (2%). Os autores

sugerem uma correlação positiva entre o *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e este patógeno, citando este carrapato como possível vetor para *H. canis* (O'DWYER et al., 2001). No presente trabalho não foram pesquisados ectoparasitas, porém as amostras foram oriundas de cães da Zona Norte, em região próxima à Serra da Cantareira, onde o ambiente de Mata Atlântica é propício para a manutenção de carrapatos do gênero *Amblyomma*, fato que pode corroborar com a taxa relativamente alta de amostras positivas para *Hepatozoon* spp.

Nos casos de infecção única por *Hepatozoon* spp. detectados em nossa pesquisa foram observados sinais gastrointestinais, apatia, desidratação, mucosas hipocoradas, hematuria, perda de peso, hipertermia, hemorragias, sinais respiratórios e óbito. No Brasil, a espécie até então descrita é o *H. canis* (RUBINI et al., 2005;2006). De acordo com Paludo e colaboradores (2003), poucos dados na literatura indicam que a infecção por *H. canis* resulte em sinais clínicos detectáveis de doença. Baneth e colaboradores (2003) afirmam que a infecção com *H. canis* pode provocar uma síndrome clínica caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, anemia, descarga ocular e fraqueza dos membros posteriores.

Em Brasília, 36% de 22 cães de um canil diagnosticados com *Hepatozoon* spp. através de esfregaço sanguíneo apresentavam perda de peso, mucosas pálidas e anorexia (PALUDO, 2003). Um relato de 3 casos confirmados através do mesmo método diagnóstico, relata apatia, prostração, tremores musculares, anorexia, ataxia, sinais respiratórios, hipertermia, linfadenopatia e gastroenterite hemorrágica, porém os autores não descartam doenças concomitantes como Parvovirose, Cinomose, EMC e Babesiose Canina (AGUIAR et al., 2004).

Anormalidades laboratoriais classicamente observadas na hepatozoonose incluem anemia normocítica normocrômica (INOKUMA et al., 2002; PALUDO et al., 2003) e leucocitose neutrofílica (GONDIM et al., 1998; GAVAZZA et al., 2003; AGUIAR et al., 2004; VOYVODA et al., 2004). As amostras positivas apenas para *Hepatozoon* spp. apresentaram valores médios de 21709 leucócitos/ μ l e hematócrito de 34,69%, caracterizando leucocitose e anemia leve. Anemia leve foi observada em cães naturalmente infectados em Brasília, enquanto valores de leucócitos totais apresentaram-se dentro dos limites de referência (PALUDO et al., 2005). De 13 cães

naturalmente infectados, 3 destes apresentaram anemia e 1 apresentou leucocitose (O'DWYER et al., 2006).

6.5 Infecção por *Mycoplasma* spp.

A análise molecular para *Mycoplasma* spp. foi positiva para apenas uma amostra em coinfeção com *Hepatozoon* spp. e *B. canis vogeli* (0,86%). A ocorrência também foi baixa em pesquisa de *M. haemocanis* em amostragem de 42 cães na região do Pantanal Mato-grossense (4,7%) (SOUZA et al., 2017) e em outro estudo no mesmo estado com cães da área urbana (4,2%) (SOARES et al., 2016). No estado de Pernambuco foi encontrada frequência de 0,49% de infecções por *M. haemocanis* sendo associada com *A. platys* (RAMOS et al., 2010) e em São Paulo, em pesquisa com 154 amostras, 1,9% foram positivas para *M. haemocanis* e 0,6% para *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*.

Em pesquisa realizada no Paraná, um total de 44,7% (59/132) de amostras foram positivas para hemoplasmas, sendo 21 positivas para *M. haemocanis*, 12 para *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* e 21 coinfectadas com os dois agentes (VIEIRA et al., 2015).

O animal com PCR positivo para *Mycoplasma* spp. na presente pesquisa apresentava sinais gastrointestinais e hipertermia. As manifestações clínicas e a severidade da doença dependem de fatores como a espécie infectante e a presença de doenças concomitantes ou infecções. As condições da maioria dos estudos (amostras de conveniência) não foram capazes de inferir a distinção entre os sinais de doença aguda e crônica (ROURA et al., 2010).

Valle e colaboradores encontraram 5,1% de positivos para *Mycoplasma haemocanis* e 1,8% para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Todos os cães possuíam doenças concomitantes, principalmente neoplásicas (VALLE et al., 2014).

Doenças concomitantes podem predispor infecções por hemoplasmas devido à imunossupressão causada por citocinas em doenças crônicas (dos SANTOS et al., 2008; BIONDO et al., 2009).

O valor de hematócrito do paciente com infecção por *Mycoplasma* spp. foi de 55% e leucócitos totais de 11300/ μ l. Por se tratar de um caso de coinfeção, não é possível relacionar os valores, porém nos cães positivos para *M. haemocanis*, Valle e colaboradores não encontraram variações hematológicas e bioquímicas decorrentes da infecção (VALLE et al., 2014).

6.6 Infecção por *Rangelia vitalii*

Duas amostras (1,62%) foram positivas na PCR para *R. vitalii*, tratando-se de casos de infecções mistas com *Hepatozoon* spp. e *B. canis vogeli*. Na capital do estado de São Paulo não há relatos de infecções por esse agente. Em Itupeva, no mesmo estado, um caso foi relatado no ano de 2017 (LÚCIO, 2017). No estado do Paraná, a rangeliose foi relatada em cão de Tijucas do Sul, por diagnóstico histopatológico (SOUSA e LEITE, 2011). Em estudo realizado com 26 cães da região metropolitana de Curitiba, 3 foram positivos para *R. vitalii* através de PCR e sequenciamento genético (SILVA, 2017), assim como na cidade de Guarapuava, no mesmo estado, onde 3 amostras foram positivas para o agente entre 75 estudadas (MONGRUEL, 2018).

No Rio Grande do Sul a frequência de amostras positivas para *R. vitalii* foi de 7,5% (MALHEIROS, 2016) e 6,8% (GOTTLIEB et al., 2016). Já no Rio de Janeiro, um estudo com 36 cães cita todos positivos para o agente, sendo que 24 apresentavam manifestações clínicas compatíveis (LEMOS et al., 2017).

No presente estudo os cães positivos para *R. vitalii* apresentaram sintomatologia locomotora, respiratória, gastrointestinal, hematúria, linfadenopatia,

hipertermia, perda de peso e epistaxe, corroborando parcialmente com estudos prévios (PESTANA, 1910a; LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013). O cão positivo na região metropolitana de Curitiba apresentou apatia, anorexia, desidratação, icterícia e hemorragia (SILVA, 2017). Em outro estudo a icterícia foi observada com frequência em cães com rangelióse (FIGHERA *et al.*, 2010).

Nos cães do estudo de Passo Fundo foram relatadas depressão, febre, anorexia, edemas e hemorragias espontâneas (GOTTLIEB *et al.*, 2016), assim como dos casos do Rio de Janeiro, onde ocorreram febre e sangramentos (LEMOS *et al.*, 2017). A hemorragia pode ocorrer devido a um déficit na hemostasia primária, que está associada à trombocitopenia e/ou à vasculopatia (PAIM *et al.*, 2012). A diátese hemorrágica (hemorragias) na rangelióse é comumente descrita em casos de infecção natural e experimental (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; PAIM *et al.*, 2012). Os cães deste estudo não apresentaram hemorragias em extremidades, mas um dos casos teve ocorrência de epistaxe por vários dias consecutivos, além de hematúria e gastroenterite hemorrágica.

Os achados hematológicos mais comuns em Rangeliose são a anemia e trombocitopenia (FIGHERA *et al.*, 2010; PAIM *et al.*, 2012b). No presente estudo, a média de hematócrito dos cães positivos foi de 32,4%, porém em um primeiro hemograma um dos cães estava com 10% e, o segundo cão positivo já havia sido tratado com Doxiciclina e Cloridrato de Imidocarb. O cão positivo em Guarapuava também demonstrava anemia no hemograma (MONGRUEL, 2018) assim como os positivos no Rio de Janeiro (LEMOS *et al.*, 2017). A anemia da doença inflamatória está associada a várias doenças crônicas, incluindo doenças infecciosas e é caracterizada pela diminuição da meia vida dos eritrócitos, inibição do metabolismo do ferro e da eritropoiese na medula óssea (FRY, 2010). Esse achado também pode ser relacionado à depressão imunomediada da medula óssea, onde ocorre uma produção específica de anticorpos anti-eritrocitários (FREDO *et al.*, 2017).

No leucograma dos cães positivos neste estudo verificou-se leucocitose (18150/ μ l). Essa alteração no leucograma está associada à presença de inflamação (SCHULTZE, 2010). Na rangelióse o estímulo prolongado e acentuado da medula óssea ocorre pela presença do protozoário (FRANÇA *et al.*, 2010). O desvio nuclear

de neutrófilos à esquerda também foi descrito em estudos recentes com cães infectados (FREDO et al., 2017; SILVA et al., 2017).

6.7 Infecção por *Rickettsia rickettsii*

Apesar da proximidade do local da pesquisa com regiões de fragmentos de Mata Atlântica, ambiente propício para o desenvolvimento dos vetores do gênero *Amblyomma* (PINTER et al., 2004; SCINACHI et al., 2017), nenhuma amostra foi positiva para *R. rickettsii* no presente estudo. Até o momento, existe apenas um relato de pesquisa molecular de *R. rickettsii* em cães no Brasil (LABRUNA et al., 2009).

A pesquisa molecular à cerca do gênero *Rickettsia* tem ocorrido através de ectoparasitas em diferentes partes do país. No Mato Grosso do Sul, em uma pesquisa realizada com 2015 carrapatos apenas 1 (*R. sanguineus*) foi positivo para *R. rickettsii* (ALMEIDA et al., 2013). Em São Paulo, 1,3% dos carrapatos identificados como *R. sanguineus* foram positivos para esse agente na PCR (MORAES-FILHO et al., 2009). Já em Juiz de Fora/MG, onde dois casos fatais de FMB foram relatadas entre 2007 e 2008, a PCR foi positiva em 13,1% dos *R. sanguineus* coletados de cães (PACHECO et al., 2011). Um carrapato dessa mesma espécie foi encontrado infectado por *R. rickettsii* em uma região de fragmentação da Mata Atlântica no Ceará (SILVA et al., 2017).

Além de relatos em carrapatos *R. sanguineus*, outras espécies também foram relatadas infectadas no Brasil. Na região da Lagoa da Pampulha, área endêmica para FMB, um carrapato da espécie *A. sculptum* foi encontrado infectado por *R. rickettsii* (LABRUNA et al., 2016). Já em pesquisa realizada com cães, cavalos e carrapatos em região de Mata Atlântica na Bahia, nenhum carrapato foi positivo para *R. rickettsii*, sendo encontrado um ectoparasita da espécie *A. ovale* infectado por *R. parkeri*.

Pinter e Labruna (2006) em pesquisa realizada com 669 exemplares de *A. aureolatum*, em uma área endêmica para FMB, no município de Taiaçupeba-SP, detectaram a presença de *R. rickettsii* em 6 espécies amostrados, demonstrando uma taxa de infecção de 0,89%, semelhante a taxa que encontrada por Carvalho (2017)

em Itu de 0,74% dos carrapatos positivos para *Rickettsia* do grupo do FMB (PINTER E LABRUNA, 2006; CARVALHO, 2017).

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a presença de *A. platys*, *B. canis vogeli*, *E. canis*, *Hepatozoon* spp., *Mycoplasma* spp. e *R. vitalli* em cães da Zona Norte da cidade de São Paulo/SP através de pesquisa molecular, além da descrição de alterações clínicas e laboratoriais apresentadas pelos animais estudados. Esses patógenos tem sido detectados em outras regiões do país, porém este é o primeiro relato da ocorrência de *Rangelia vitalii* na Zona Norte de São Paulo, destacando-se a importância de se incluir este agente no diagnóstico diferencial de cães com sinais clínicos e anormalidades hematológicas sugestivas de hemoparasitoses, assim como aumentar a vigilância dos médicos veterinários quanto à quadros de infecções mistas.

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.

ALVES, T.B. et al. Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Arch. med. vet.** [online]. 2014, vol.46, n.2, pp.333-336.

ARAES-SANTOS, A. I. et al. Ectoparasite Infestations and Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**. v. 15, n. 11, 2015.

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

ARAGÃO, H. 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 31: 759-843.

BANETH G; MATHEW J.S.; SHKAP V.; MACINTIRE D.K.; BARTA J.R; EWING S.A. 2003. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate Hepatozoon spp. **TRENDS in Parasitology**. 19: 27-31.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA M.; BECHARA, G. H. 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, **Vox/ICTTD-3/Butantan**, 223p.

BIONDO, A.W.; DOS SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M., et al. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet** 2009;18:1- 7

BIRKERHEUER, A. J. Babesiosis. In: GREENE, Craig E. Infectious diseases of the dog and cat. 4.ed. p. 773, 778, 781-783. cap. 76. [s.l.]: Elsevier, 2012.

BOOZER, A.L.; MACINTIRE, D.K. Canine babesiosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 2003;33:885–904.

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.

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; HEGARTY, B. C. e HANCOCK, S.I., (1997). Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **American Society for Microbiology**, v.42, (2), p.362-368.

BREITSCHWERDT, E. B.; PAPICH, M. G.; HEGARTY, B. C.; GILBER, B.; HANCOCK, S. I.; DAVIDSON, M. G. Efficacy of doxycycline, azithromycin, or trovafloxacin for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. **Antimicrobial Agents and hemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 813-821. 1999.

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.

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.

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

CANUTO, F. J. C.; MATIAS, A. L. M. e CORTEZ, A. A. 2016. **Achados hematológicos de cães positivos para babesiose em fortaleza**, Ceará. IV Congresso Estudantil de Medicina Veterinária da UECE. Ciência Animal, Fortaleza, Ceará.

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.

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.

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.

CARVALHO, T. R. V. **Pesquisa Sorológica em cães e pesquisa molecular em Carrapatos para Febre Maculosa Brasileira no município de Itu- SP**. 2017. Dissertação (Programa de mestrado em medicina e Bem-Estar Animal) - Universidade de Santo Amaro. São Paulo, 2017.

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.

COCKBURN, C.; TROY, G.C. A retrospective study of sixty-two cases of thrombocytopenia in the dog. **South Vet** 1986;37:133-141.

CODNER, E.C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G.K. et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am J Vet Res** 1992;53:2286–2291.

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

COSTA, H. X. **Interação de hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia-GO**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária – Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2015.

COSTA, A. P. et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [online]. 2015, vol.24, n.1

CONSTANTINO C. et al. Survey of spatial distribution of vector-borne disease in neighborhood dogs in southern Brazil. **Open Vet J**. 2017; 7(1): 50–56

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.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Vet Parasit.**, v. 117, p. 285- 290, 2003.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Rev Bras Parasitol Vet** 2009; 18(4): 20-25.

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

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

DANTAS-TORRES F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J.M.; BERNARDI, L.F.O.; FERREIRA, R.L.; ONOFRIO, V.C.; MARCILI, A.; BERMÚDEZ, S.E.; RIBEIRO, A.F.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Description of a New Species of Bat-Associated Argasid Tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **J Parasitol** 2012; 98:36-45.

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.

DE CAPRARIIS, D. et al. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Vet Microbiol** 2011;149:206–212.

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.

DE SOUSA, K. C. M. et al. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. **Acta Trop.** 2017 Jul;171:172-181.

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.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot**, v. 28, p. 408-409, 1935.

DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W. et al. Hemoplasma infection in HIVpositive patient, Brazil. **Emerg Infect Dis** 2008;14:1922-4. 36.

DUMLER, J.S.; BARRET, A.F.; BEKKER, C.P.; et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species os *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocitophila*. **Int. J. Sys. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

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.

EIRAS, D.F.; CRAVIOTTO, M.B.; BANETH, G.; MORÉ, G. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. **Parasitol Int**, v.63, p.729-734, 2014.

EZEOKOLI C.D.; OGUNKOYA A.B.; ABDULLAHI R. 1983. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. **Journal Small Animal Practice**. 24:455-460.

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.

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, K. R.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 1-7, 2005.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. Retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 194- 201, 1999.

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.

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

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

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.

GAVAZZA, A.; BIZZETI, M.; PAPINI, R. 2003. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue Med Vet**. 154: 565-571.

GOTTLIEB, J. 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

GOMES, L.S. Thyphoexanthematico de São Paulo. **Brasil-médico**, V.17, p.919-921, 1933.

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. et al. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [online]. 2016, vol.25, n.2

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.; 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.

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.

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.

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

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v.141, p. 360-363, 1997a.

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.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v.187, p. 292–296, 2011.

HASEGAWA, H.Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. 2005. 134 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.**, v. 137, p. 182-188, 1978.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

INOKUMA H.; OHNO K.; YAMAMOTO S. 1999. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 61: 1153–1155.

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.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1658–1662, 1994.

IRWIN, P.J.; HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. **Aust Vet J** 1991;68:204–209.

IRWIN, P.J. The first report of canine ehrlichiosis in Australia. **Aust Vet J**. 2001;79:552–553.

KEMMING, G.I.; MESSICK, J.B.; ENDERS, G. et al. *Mycoplasma haemocanis* infection: a kennel disease? **Comp Med** 2004;54:404–409.

JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C.; BALARIN, M. R. S.; FABRETTI, A. K.; GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, p. 277-283, 2008.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Editora Manole, p.605-607, 2000.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

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.

KIKUTH, W. A new cause of anaemia, *Bartonella canis* nov. sp. **Klin. Wochenschr.**, v.7, p. 1729, 1928.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L.; GRAÇA, D.L. **Protozoa-related immune-mediated hemolytic anemia – case report** [poster PT.012]. In: Seventh Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine; 2003 June 22-26. Paraná: Mabu Thermas & Resort Iguaçu Falls; 2003.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R.A.; GRAÇA, D.L. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Medvep – Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim** 2003b; 1(4):273-81.

KRAWCZAK FS, NIERI-BASTOS FA, NUNES FP, SOARES JF, MORAES-FILHO J, LABRUNA MB. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasit Vectors** .2014 .

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

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.

LASTA, C.S., DOS SANTOS, A.P., MESSICK, J.B., OLIVEIRA, S.T., BIONDO, A.W., VIEIRA, R.F.C., DALMOLIN, M.L., GONZÁLEZ, F.H.D. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 22, 360- 366.

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.

LEMOS, 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.

LEMOS, T.D.; TOMA, H.K.; ASSAD, R.Q.; SILVA, A.V.D.; CORRÊA, R.G.B.; ALMOSNY, N.R.P. Clinical and hematological evaluation of *Rangelia vitalii*-naturally infected dogs in southeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v. 26, p.307–313, 2017.

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.

LOPES, S. dos A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. dos. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3.ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. p. 21.

LOPES, Marcos Gomes et al. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* and probable exposure to *Rickettsia amblyommatis* in dogs and cats in Natal, RN. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [online]. 2019, vol.28, n.1

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. Anaplasnose trombocítica canina – uma breve revisão. **Rev. Cient. Elet. Med. Vet.**, v. 15, 2010.

MALHEIROS, J.; COSTA, M.M.; AMARAL, R.B.DO; SOUSA, K.C.MDE; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z.; VIEIRA, M.I.B. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 2016; 7(5): 893-900.

MANOEL, C.S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

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.

MELO, A.L.; WITTER, R.; MARTINS, T.F.; PACHECO, T.A.; ALVES, A.S.; CHITARRA, C.S., et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Med Vet Entomol** 2016; 30(1): 112-116.

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.

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, 2009.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica** 117 (2011) 51-55.

MORAES-FILHO, J. **Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina.** [Vector competence of the group *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil, Argentina and Uruguay for transmission of the bacterium *Ehrlichia canis*, causative agent of canine monocytic ehrlichiosis]. 2013. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

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

MURASE, T.; IWAI, M.; MAEDE, Y. Direct evidence for preferential multiplication of *Babesia gibsoni* in young erythrocytes. **Parasitology Research**, v. 4, n. 79, p. 269-71, 1993.

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.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. **Vet Micr**. 2003;91:197-204.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 174-184, 2004.

MYLONAKISETAL, et. al. Na update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The Veterinary Journal**, v. 246, p.45-53, 2019.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; et al. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Revista Ciência Rural**. v.38, n.3, p.766-770, 2008.

NEER, M. T.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus statement on ehrlichial disease os small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 309-315, 2002.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças bacterianas polissistêmicas. In:_____. **Medicina interna de pequenos animais**. Tradução Aline Santana da Hora. 4ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 1317-1319.

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.

O'DWYER, L. H.; LOPES, V. V. A.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. D. S.; RIBOLLA, P. E. M. Infecção por *Babesia* spp. em cães de áreas rurais do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 18, n. 2, p. 23-26, abr.-jun. 2009

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.

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.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. **Trends Parasitol.** 2009;25:228–235. doi: 10.1016/j.pt.2009.02.005.

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.

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.

PESTANA, B. R. O nambyuvú (nota preliminar). **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, v. 5, p. 14-17, 1910.

PIANA, G.P.; GALLI-VALERIO, B. Su di un infezione del cane com parassiti endoglobulari. **Il Moderno Zooiatro.**, v. 6, p. 163-169, 1895.

PINTER, A. Aspectos epidemiológicos da Febre maculosa em uma área endêmica no município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do Ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). 2003. **Tese de Doutorado**. University of São Paulo.

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.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia belli* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

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.

RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial diseases**. New York London: CRC Press, 2007.

REZENDE, H.E.B. **Sobre a validade de *Rangelia vitalli* (Pestana, 1910) hemoparasito de cães no Estado do Rio de Janeiro.** In: XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária do Rio de Janeiro; 1976; Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro; 1976. p.159-60.

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.

RIBEIRO, C. M. et al. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 37(2):129-136, fevereiro 2017.

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

RIVERO, R.; MINOLI, P.; PARODI, P.; MATTO, C.; ARMÚA-FERNÁNDEZ, M.T.; GIANNEECHINI, E.; CARVALHO, L.; VENZAL, J.M. Descripción de un foco de rangeliosis canina en el litoral noroeste del Uruguay. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 54, p.15–22, 2017.

ROTONDANO, T.E.F.; ALMEIDA, H.K.; KRAWCZAK FS, SANTANA VL, VIDAL IF, LABRUNA MB, et al. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet** 2015; 24(1): 52-58.

ROTONDANO, T. E. F. et al. *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**[online]. 2017, vol.26, n.2 [cited 2019-06-23], pp.211-215.

ROURA, X.; PETERS, I.R.; ALTET, L. et al. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **J Vet Diagn Invest** 2010, 22: 270-274.

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 A.S.; PADUAN K.S.; CAVALCANTE G.G.; RIBOLLA P.E.M.; O'DWYER L.H. 2005. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. . **Parasitology Research**. 97: 91-93.

RUBINI A.S.; PADUAN K.S.; PEREZ R.R.; RIBOLLA P.E.M.; O'DWYER L.H. 2006. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Veterinary Parasitology**. 137: 168–171.

SAHNI, S. K.; RYDKINA, E. Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species. **Future Microbiology**., v. 4, p. 323-339, 2009.

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**. 2003;70:205–12.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; 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. **Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145-148, jan. 2009.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria municipal de implementação das Subprefeituras. **Grupo de articulação para elaboração dos planos diretores**. São Paulo (SP), 2002.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual do Meio Ambiente. **Base de dados (SIG). Inventário Florestal da Vegetação Natural do Estado de São Paulo**: INSTITUOFLORESTAL. São Paulo, 2010.

SÃO PAULO (Estado). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). **Clima dos Municípios Paulistas**, 2017. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outrasinformacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>>. Acesso em 19 de maio de 2019.

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

SCINACHI, C. A., TAKEDA, G. A. C. G., MUCCI, L. F., & PINTER, A. (2017). Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**, 166, 225–233. doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.025

SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol** 2001; 17(2): 74-80.

SILVA, A. B.; COSTA, A. P.; SÁ, J. C.; COSTA, F. B.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 3, p. 388-395, jul./set. 2012.

SILVA, M.C.A.; MUNDIM, A.V.; MENDONÇA, G.A.; MUNDIM, M.J.S.; GUIMARÃES, E.C. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.5, p. 892-900, 2014.

SILVA, V. C. L. et al. 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, B. R. et al . Detection molecular of *Rangelia vitalii* in dogs from Parana State, Southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, 2018.

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, R. L. et al. Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [online]. 2016, vol.25, n.3, pp.360-363.

SOARES, R. et al. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **An. Acad. Bras. Ciênc.** [online]. 2017, vol.89, n.1, pp.301-306.

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 rangelirosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, p. 1221-1234, 2018.

SOUSA, V. R. F.; BOMFIM, T. C. B.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L. Coinfecção por *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs diagnosed by PCR. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 3, p. 281-283, 2009.

SOUSA, K.C.M.; ANDRE, M.R.; HERRERA, H.M.; ANDRADE, G.B., JUSI, M.M.G; SANTOS, L.L., et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet** 2013; 22(4): 525-531.

SPAGNOL, C.; LORETTI, A.; CORREA, A.; PESCADOR, C.; ROZZA, D.; CONCEIÇÃO, E. et al. **Parasitismo de cães por *Rangelia vitalii* no Estado do Rio Grande do Sul** [resumo 211]. In: XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica; 2003; Porto Alegre. Livro de resumos. Porto Alegre: PROPESQ; 2003. p.232-3.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; CALIARI, K. M.; YOSHINARIN, N. H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, n. 4, p. 357-361, 2009.

SUMMER, J.W.; NICHOLSON, W. L.; MASSUNG, R. F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2087-2092, 1997.

SZABÓ, M.P.J. et al. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.131-140, 2005.

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

TARIFA, J. R. e AZEVEDO, T. R.. Os Climas na Cidade de São Paulo – Teoria e Prática. In: **GEOUSP** – Coleção Novos Caminhos. Universidade de São Paulo, n 4., 2001.

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

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

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.

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

URQUHART, et al. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 214, 1998.

VALLE, S. F. et al. Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 37 (2014) 259–265.

VALENTE, P. C. L. G. **Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais**. 2014. 58f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Minas Gerais, 2014.

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.

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

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, 1997.

VICTOR, M. A. M., et al. Cem anos de devastação. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 28, 1975.

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

VIEIRA, R. F. C. et al. MOLECULAR INVESTIGATION OF HEMOTROPIC MYCOPLASMAS IN HUMAN BEINGS, DOGS AND HORSES IN A RURAL SETTLEMENT IN SOUTHERN BRAZIL. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** [online]. 2015, vol.57, n.4, pp.353-357.

VOYVODA, H.; PASA, S.; UNER, A. 2004. Clinical Hepatozoon canis infection in a dog in Turkey. **Journal of Small Animal Practice**. 45: 613–617.

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.

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.

WANER, T.; HARRUS, S. Anemia of inflammatory disease. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Scham's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Pippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 205-209.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; et al. Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with Doxycycline. **Journal of clinical microbiology**, v.35, n. 7, p. 1852–1855, 1997.

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.