

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Mariana Rodrigues Pereira

**OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE HEMOPATÓGENOS EM CADELAS
PRENHES E NATURALMENTE INFECTADAS NA CIDADE DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS, BRASIL**

Belo Horizonte
2026

Mariana Rodrigues Pereira

**OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE HEMOPATÓGENOS EM CADELAS
PRENHES E NATURALMENTE INFECTADAS NA CIDADE DE BELO HORIZONTE, MINAS
GERAIS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Camila de Valgas e Bastos Castro
Coorientadora: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

**Belo Horizonte
2026**

P436o Pereira, Mariana Rodrigues, 1997-
Ocorrência de transmissão vertical de hemopatógenos em cadelas prenhes e naturalmente infectadas na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil/ Mariana Rodrigues Pereira.- 2026.
134 f. il.

Orientadora: Camila de Valgas e Bastos Castro
Coorientadora: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Inclui Bibliografia

1. Cão - Doenças - Teses – 2. Cão - Doenças – Parasito - Teses – 3. Doenças transmissíveis - Teses - I. Castro, Camila de Valgas e Bastos – II. Silveira, Júlia Angélica Gonçalves da – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 636.708.96

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO
MARIANA RODRIGUES PEREIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE HEMOPATÓGENOS EM CADELAS PRENHES E NATURALMENTE INFECTADAS NA CIDADE DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**".

Aprovado(a) em 10 de fevereiro de 2026, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Camila de Valgas e Bastos Castro - Orientador(a)

Dr.(a). Simone Magela Moreira

Dr.(a). Luiz Eduardo Duarte de Oliveira



Documento assinado eletronicamente por **Camila de Valgas e Bastos Castro, Professora do Magistério Superior**, em 11/02/2026, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Magela Moreira, Usuário Externo**, em 11/02/2026, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Eduardo Duarte de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 13/02/2026, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4895841** e o código CRC **54D6B2A1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares, minha esposa e amigos que, de alguma forma, prestaram seu suporte e apoio em algum momento de todos os meus anos de estudo, desde o começo de tudo, para que eu pudesse construir esse caminho e chegar ao dia de hoje. Sobretudo agradeço a minha mãe, Regina, pelo exemplo, apoio e amor incondicional.

Às minhas orientadoras de mestrado, profas. Dras. Camila e Júlia, pela oportunidade, confiança, apoio e imensa contribuição intelectual e profissional durante a pós-graduação. Obrigada por dividir uma pequena parte das suas grandes jornadas comigo, vocês são exemplos de pesquisadoras, orientadoras, mulheres e mães para mim. Sorte a minha dividir essa caminhada com vocês.

Aos membros da banca examinadora, a Professora Dra. Simone Magela Moreira e ao Professor Dr. Luiz Eduardo Duarte de Oliveira, e suplentes, Dr. Anisleidy Pérez Castillo e a Professora Dra. Diana Cuglovici Abrão pela disponibilidade e relevantes contribuições;

A diretora técnica, Isabela Sales, e todos os demais colaboradores do Ame Hospital Veterinário que, gentilmente, me receberam, auxiliaram, e disponibilizaram as amostras para este estudo;

Aos amigos do laboratório Protovet, em especial aos meus parceiros Pedro, Nicolas, Andressa, Anisleidy, João Paulo, Markus, Ana Julia e Maycos pelos momentos compartilhados e todo o auxílio e tempo despendidos para compartilharmos experiências, dúvidas, descobertas e ensinamentos. Vocês são uma família para mim.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo suporte para condução deste estudo;

À Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos e experiências adquiridos ao longo desses anos;

Ao DMVP (EVUFMG) e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela disponibilidade de infraestrutura dos laboratórios;

E a todos(as) que de algum modo contribuíram para esta realização.

Todo o meu respeito e gratidão a vocês. Espero que sempre tenhamos novas oportunidades de reencontros.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

RESUMO

A proximidade entre cães (*Canis familiaris*) e humanos, associada a fatores como alta densidade populacional, vida livre e mobilidade, favorece o papel dos cães como reservatórios e disseminadores de agentes patogênicos. Entre esses agentes, destacam-se os hemopatógenos transmitidos por vetores, amplamente distribuídos, especialmente em regiões tropicais, e de grande relevância no contexto da Saúde Única, por causarem importantes enfermidades em cães no Brasil. Apesar de a transmissão vetorial ser bem estabelecida, a transmissão vertical desses agentes permanece pouco investigada. Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de transmissão vertical de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon* sp., *Leishmania* sp. e *Mycoplasmas* hemotrópicos em cadelas prenhes naturalmente infectadas. No Capítulo 1, descreve-se o primeiro relato de transmissão transplacentária de *E. canis* em cães, com análises moleculares realizadas em 51 amostras de sangue total de cadelas no pré-parto, 51 placentas correspondentes, 22 *pools* de baço e fígado de natimortos e 40 amostras de sangue total de neonatos com até cinco dias de vida. Os achados sustentam a transmissão vertical, por métodos moleculares, em dois (9.09%) *pools* de órgãos e em um (2.5%) neonato. No Capítulo 2, foram investigados, através de metodologias moleculares seguidas de análises filogenéticas, a ocorrência dos demais hemopatógenos e possíveis coinfeções nas mesmas amostras examinadas no Capítulo 1. Os resultados revelaram transmissão vertical de *A. platys* em 7% dos *pools* de órgãos e de hemoplasmas em 31,81% do mesmo material, além do primeiro registro de transmissão transplacentária de *B. vogeli*, detectada em 13,63% dos natimortos e 25% dos neonatos. Não foi detectada infecção por *A. phagocytophilum*, *Leishmania* sp. e *Hepatozoon* sp. em nenhum dos materiais testados. Por fim, o Capítulo 3 analisa os achados hematológicos das cadelas gestantes infectadas, incluindo monocitose, trombocitose e anemia, com ênfase nas alterações associadas à presença de hemopatógenos e discutindo o possível impacto fisiopatológico dessas infecções durante a gestação. A confirmação dessa via de transmissão tem implicações epidemiológicas relevantes, pois pode permitir a manutenção dos agentes infecciosos nas populações caninas mesmo na ausência do vetor, comprometendo a eficácia de estratégias de controle baseadas exclusivamente no combate aos artrópodes, como o uso de ectoparasiticidas. Associado a isso, a compreensão da patogênese dessas infecções durante a gestação fornece informações que podem contribuir para o manejo clínico e terapêutico, auxilia na implementação de medidas preventivas e no diagnóstico precoce no período periparto, além de ampliar a compreensão da interação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: Hemoparasitos; patógenos transmitidos por vetores, transmissão transplacentária, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

The close relationship between dogs (*Canis familiaris*) and humans, associated with factors such as high population density, free-roaming lifestyle, and mobility, favors the role of dogs as reservoirs and disseminators of pathogenic agents. Among these agents, vector-borne hemopathogens stand out, being widely distributed, especially in tropical regions, and of great relevance in the One Health context, as they cause significant diseases in dogs in Brazil. Although vector transmission is well established, vertical transmission of these agents remains poorly investigated. This study aimed to investigate the occurrence of vertical transmission of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon* sp., *Leishmania* sp., and hemotropic *Mycoplasma* in naturally infected pregnant bitches. Chapter 1 describes the first report of transplacental transmission of *E. canis* in dogs, with molecular analyses performed on 51 whole blood samples from prepartum bitches, 51 corresponding placentas, 22 spleen and liver pools from stillborn puppies, and 40 live neonates up to five days old. The findings support vertical transmission, based on molecular methods, in two (9.09%) organ pools and in one (2.5%) neonate. In Chapter 2, the occurrence of the other hemopathogens and possible coinfections in the same samples examined in Chapter 1 were investigated through molecular methodologies followed by phylogenetic analyses. The results revealed vertical transmission of *A. platys* in 7% of the organ pools and of hemoplasmas in 31.81% of the same material, in addition to the first record of transplacental transmission of *B. vogeli*, detected in 13.63% of the stillborns and 25% of the neonates. Infection by *A. phagocytophilum*, *Leishmania* sp., and *Hepatozoon* sp. was not detected in any of the tested materials. Finally, Chapter 3 analyzes the hematological findings of infected pregnant bitches, including monocytosis, thrombocytosis, and anemia, with emphasis on the alterations associated with the presence of hemopathogens and discussing the possible pathophysiological impact of these infections during pregnancy. The confirmation of this transmission route has relevant epidemiological implications, as it may allow the maintenance of infectious agents in canine populations even in the absence of the vector, compromising the effectiveness of control strategies based exclusively on arthropod control, such as the use of ectoparasiticides. In addition, understanding the pathogenesis of these infections during pregnancy provides information that may contribute to clinical and therapeutic management, assist in the implementation of preventive measures and early diagnosis in the peripartum period, and broaden the understanding of the parasite–host interaction.

Keywords: Hemoparasites; vector-borne pathogens; transplacental transmission; molecular diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS	
Figura 1	Avaliação de marcadores específicos durante os estágios iniciais da gestação canina..... 30
Figura 2	Descrição de materiais coletados no estudo..... 35
Figura 3	Procedimentos de coleta das amostras: (A) Avaliação clínica com realização de ultrassonografia gestacional; (B) Cesariana eletiva realizada em bloco cirúrgico veterinário; (C) Ambiente cirúrgico equipado para procedimentos estéreis, com incubadora individualizada destinada ao suporte neonatal imediato..... 36
Figura 4	(A e B) Ala de maternidade do hospital veterinário onde, após a realização das cesarianas, as mães e seus filhotes permaneciam em observação. O ambiente é monitorado, limpo e equipado com incubadoras para suporte neonatal, apresentando condições desfavoráveis à presença de ectoparasitos. (C) Tubos Falcon contendo fragmentos placentários armazenados após a segregação realizada no laboratório Protovet. (D) Filhote natimorto aguardando o processo de descongelamento para posterior preparo do pool de órgãos. (E) Papel filtro impregnado com sangue de neonato vivo, obtido por punção auricular..... 37
Figura 5	Fluxograma das análises laboratoriais..... 38
Figura 6	Árvore filogenética baseada em um alinhamento de 463 pb do gene do rRNA 16S de <i>Ehrlichia</i> spp. envolvendo 23 sequências nucleotídicas, utilizando o método de máxima verossimilhança e K2 + G como modelo evolutivo. Os números nos nós de ramificação da árvore indicam valores de bootstrap de 1000 repetições. A barra de escala representa a distância evolutiva. As

	sequências detectadas no presente estudo estão em negrito, com os números de acesso fornecidos entre parênteses. <i>Anaplasma marginale</i> e <i>A. phagocytophilum</i> foram usadas como grupos externos..... 52
Figura 7	Árvore filogenética baseada em um alinhamento de 630 pb do gene 16S rRNA de <i>Anaplasmas</i> pp. envolvendo 24 sequências nucleotídicas, utilizando o método de máxima verossimilhança e K2 + G como modelo evolutivo. Os números nos nós de ramificação da árvore indicam os valores de bootstrap de 1000 replicações. A barra de escala representa a distância evolutiva. As sequências detectadas no presente estudo estão destacadas em negrito, com os números de acesso fornecidos entre parênteses. <i>Rickettsia rickettsii</i> foi usada como grupo externo..... 66
Figura 8	Árvore filogenética baseada em um alinhamento de 602 pb da <i>Babesia vogeli</i> . O gene ITS 1 e ITS 2 envolvendo 34 sequências nucleotídicas, utilizando o método de máxima verossimilhança e K2 como o modelo evolutivo. Os números nos nós de ramificação da árvore indicam os valores de bootstrap a partir de 1000 repetições. A barra de escala representa a distância evolutiva. As sequências detectadas no presente estudo estão destacadas em negrito, com números de acesso fornecidos entre parênteses. <i>Sarcocystis masoni</i> foram usados como grupos externos..... 67
Figura 9	Árvore filogenética baseada em um alinhamento de 600 pb do gene do rRNA 16S de <i>Mycoplasma</i> spp. envolvendo 25 sequências nucleotídicas, utilizando o método ML e TN + G como modelo evolutivo. Os números nos nós das ramificações da árvore indicam valores de bootstrap de 1000 repetições. A barra de escala representa a distância evolutiva. As sequências detectadas no presente estudo estão destacadas em negrito, com os números de acesso fornecidos entre parênteses. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> foram usados como grupos externos..... 68
Figura 10	PCA analyses performed to verify groupings between positive and negative samples for each hemopathogen: A (<i>Anaplasma</i>); B (<i>Babesia</i>); C (<i>Ehrlichia</i>), D (<i>Mycoplasma</i>)..... 93

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS	
Material e métodos	
Tabela 1	Sequência de nucleotídeos, alvo, tamanho do amplicon (pb) e referência utilizados em PCR para controle interno de extração de DNA de todas as amostras extraídas 41
Capítulo I	
Tabela 1	Sequências de primers usadas para identificar o gênero/espécie de <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Leishmania</i> spp. e gliceraldéido-3-fosfato desidrogenase (gapdh) 48
Tabela 2	Amostras positivas para <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Ehrlichia canis</i> detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue de cães naturalmente infectados e em amostras de órgãos de filhotes natimortos. A tabela inclui o número de amostras positivas (N positivos) e o número total de amostras (N total) analisadas..... 50
Tabela 3	Os materiais foram testados por nested PCR direcionada ao gene 16S rRNA para o gênero <i>Ehrlichia</i> e <i>Ehrlichia canis</i> 51
Capítulo II	
Tabela 1	Sequência de nucleotídeos, alvo, tamanho do amplicon (pb) e referência utilizados em PCR para controle interno de extração de DNA de todas as amostras extraídas..... 62
Tabela 2	Percentual de positividade de cada tipo de amostra para os diferentes agentes detectados nas reações genéricas e específicas..... 64
Tabela 3	Frequência de coinfeções detectadas nos diferentes tipos de amostras (sangue total, placenta, órgãos de natimortos e sangue de neonatos), com a correlação entre os agentes identificados..... 69

CAPÍTULO III

Tabela 1	Média, desvio padrão, valores mínimo e máximo das idades referentes às cadelas incluídas no estudo..... 82
Tabela 2	Sequências de primers utilizadas para identificar gêneros de rickettsias, gênero de protozoários e hemoplasmas..... 84
Tabela 3	Distribuição de infecções únicas e coinfeções por hemopatógenos detectados nas 43 cadelas gestantes analisadas por PCR..... 87
Tabela 4	Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo do hemograma, leucograma e concentração plaquetária no grupo de cadelas positivas e negativas para <i>Babesia</i> spp..... 88
Tabela 5	Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo do hemograma, leucograma e concentração plaquetária em cadelas positivas e negativas para <i>Anaplasmaspp</i> 89
Tabela 6	Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo do hemograma, leucograma e concentração plaquetária em cadelas positivas e negativas para <i>Ehrlichia</i> spp..... 90
Tabela 7	Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo do hemograma, leucograma e concentração plaquetária em cadelas positivas e negativas para hemoplasmas..... 91
Tabela 8	Média, desvio padrão e valores mínimo e máximo do hemograma, leucograma e concentração plaquetária em cadelas coinfectadas com mais de um hemopatógeno..... 92
Tabela 9	Valores de p dos testes t de Student e testes de Mann-Whitney na avaliação das variáveis hematológicas por hemopatógeno..... 93
Tabela 10	Síntese das variáveis hematológicas significativas por coinfeção na análise PERMANOVA..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICc	<i>Akaike Information Criterion</i>
BIC	Critério de informação bayesiano
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BFS	<i>Brazilian spotted fever</i>
cPCR	Reação em cadeia da polimerase – convencional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EMC	Erliquiose monocítica canina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HGA	Anaplasnose granulocítica humana
HGB	Hemoglobina
HLA	Antígenos leucocitários humanos
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAFFT	<i>Multiple Alignment using Fast Fourier Transform</i>
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
NK	<i>Natural Killer</i>
nPCR	Reação em cadeia da polimerase – <i>Nested</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIBF	Progesterone-induced blocking fator
Th2	<i>T helper</i>
VBPs	Patógenos transmitidos por vetores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Hemoparasitoses caninas	16
3.2 Principais hemopatógenos de cães	17
3.3 Composição placentária e aspectos fisiológicos da gestação e imunidade.....	28
3.4 Transmissão não vetorial de agentes patogênicos.....	31
3.5 Alterações hematológicas em cadelas gestantes.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Área de estudo, coleta de amostras e laudos.....	34
4.2 Análises estatísticas	37
4.3 Análises laboratoriais	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Capítulo 1. First Molecular Evidence of Vertical Transmission of <i>Ehrlichia canis</i> in Naturally Infected Female Dogs in Brazil.....	45
5.2 Capítulo 2. Molecular Evidence of vertical transmission of hemopathogens in naturally infected canines: First report involving <i>Babesia vogeli</i> and <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	58
5.3 Capítulo 3. Hematological evaluation of pre-parturient female dogs naturally infected by vector-borne pathogens in an urban area of Southeastern Brazil.....	80
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	102
7 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO	122

1. INTRODUÇÃO

A domesticação dos cães (*Canis familiaris*) representa um marco importante na história das interações entre humanos e animais. Estudos arqueológicos e genéticos mostram que o cão foi a primeira espécie domesticada, antes mesmo do surgimento da agricultura e do modo de vida sedentário (Savolainen *et al.*, 2002). Esse processo de domesticação exerceu influência sobre a cultura, a sociedade e a biologia humana, consolidando os cães como companheiros próximos ao longo da história (Larson *et al.*, 2012), e, na atualidade, como parte das famílias modernas, aumentando assim a preocupação com a manutenção da saúde e bem-estar desses animais. Paralelamente, características como alta densidade populacional, hábitos de vida livre e a capacidade de se deslocar entre diferentes tipos de ambientes contribuíram para que esses animais se tornassem potenciais reservatórios e disseminadores de agentes patogênicos, responsáveis por enfermidades de diferentes graus para os animais e com potencial zoonótico (Paschoal *et al.*, 2016). Entender mais sobre essa relação é importante para elucidar o papel dos cães na dinâmica de transmissão e manutenção de doenças que impactam tanto a saúde humana quanto a animal.

Nesse contexto, os agentes transmitidos por vetores são responsáveis por enfermidades de grande relevância no âmbito do conceito de Uma Só Saúde ou *One Health*, como por exemplo a Leishmaniose Visceral, causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Ferroglio (2018) correlaciona o aumento das infecções por *L. infantum* ao aumento do número de cães e à movimentação desses animais de áreas endêmicas para regiões anteriormente livres da doença, além de condições climáticas que promovem alterações favoráveis na biologia dos vetores, os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, enfatizando os cães como importantes reservatórios do agente patogênico para a doença.

Diante desse panorama, as hemoparasitoses têm grande importância por acometerem cães e envolverem uma ampla diversidade de vetores e agentes patogênicos. Dentre eles, destacam-se os agentes transmitidos por carrapatos como as riquetsias dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (André, 2018), os *Mycoplasma* hemotrópico ou hemoplasmas (do Nascimento *et al.*, 2012), e os apicomplexas dos gêneros *Babesia* e *Hepatozoon* (Dantas-Torres, 2008). De modo geral, essas infecções podem se manifestar de forma crônica e sem sinais clínicos evidentes (Dantas-Torres, 2008) ou, em determinadas situações, apresentar evolução aguda, levando ao aparecimento progressivo de sinais clínicos como anorexia, emagrecimento, anemia, trombocitopenia, leucopenia, comprometimento muscular e outras alterações, de acordo com a intensidade da parasitemia e a ocorrência de coinfeções (Shaw *et al.*, 2001).

O carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, é o principal vetor e responsável pela transmissão biológica das riquetsias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, além do protozoário *Babesia vogeli* (Dantas-Torres, 2008). Esses três patógenos estão entre as principais causas de doenças infecciosas que acometem cães no Brasil. O mesmo vetor também participa da transmissão de *Hepatozoon canis* (O'Dwyer, 2011), havendo ainda evidências de sua participação na disseminação de *Anaplasma phagocytophilum* (Santos *et al.*, 2013) e de *Mycoplasma* spp. Hemotrópicos (Messick, 2003). Por sua vez, o flebotomíneo *L. longipalpis* é o principal vetor responsável pela propagação de *L. infantum* no Brasil (Lainson & Rangel, 2005).

Embora a transmissão vetorial desses agentes esteja amplamente documentada na literatura, pouco se discute sobre a transmissão vertical desses patógenos, com exceção de *L. infantum*, cuja ocorrência por essa via é relatada no Brasil desde 2009 (da Silva *et al.*, 2009). Os mecanismos envolvidos nessa forma de transmissão ainda requerem investigações mais aprofundadas, embora a hipótese mais aceita seja o extravasamento de sangue na interface materno-fetal, seguido da fagocitose de células infectadas pelos trofoblastos fetais (Oliveira *et al.*, 2012; Ambrósio *et al.*, 2019).

Considerando a importância dos agentes *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *B. vogeli*, *H. canis*, *Mycoplasmas* hemotrópicos e *L. infantum* para a saúde veterinária e pública, este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de transmissão vertical desses patógenos em cadelas brasileiras naturalmente infectadas. Os achados sustentam essa via de transmissão, que pode ter como implicação epidemiológica a manutenção dos agentes infecciosos nas populações caninas mesmo na ausência do vetor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a evidência molecular da ocorrência de transmissão vertical de hemopatógenos de cadelas para neonatos pela via transplacentária.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar, por métodos parasitológico (esfregaço sanguíneo) e molecular a presença dos agentes *E. canis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, hemoplasmas, *B. vogeli*, *Hepatozoon* spp. e *Leishmania* spp., em amostras de sangue e placenta de cadelas gestantes, bem como em *pool* de órgãos de filhotes natimortos e em sangue total de

neonatos com até cinco dias de vida;

- Descrever a ocorrência de coinfeções pelos agentes pesquisados;
- Determinar, por metodologia molecular, a frequência de neonatos infectados por ninhada analisada;
- Realizar análises hematológicas (hemograma completo, índices eritrocitários, diferencial leucocitário e contagem plaquetária) em amostras sanguíneas de cadelas gestantes positivas para pelo menos um dos agentes investigados

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Hemoparasitoses caninas

Os patógenos transmitidos por vetores (*Vector Borne Pathogens*-VBPs) constituem um grupo diverso de agentes etiológicos responsáveis por algumas das principais enfermidades que acometem cães no Brasil (Dantas-Torres, 2008). Nesse cenário, os hemopatógenos transmitidos por ectoparasitos e o papel dos cães como disseminadores de microrganismos infecciosos e, por vezes, zoonóticos, assumem importância tanto na clínica médica de pequenos animais quanto na saúde pública (Dantas-Torres, 2012; Gondard *et al.*, 2017). A incidência dessas enfermidades em animais domésticos no Brasil está diretamente associada à presença e à distribuição geográfica dos vetores, sendo mais comum em regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, fatores climáticos e ecológicos têm favorecido a expansão progressiva desses patógenos para novas áreas anteriormente não endêmicas (Irwin, 2002).

Segundo Dantas-Torres (2019), a lista atualizada de carrapatos brasileiros inclui 70 espécies. O carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato é vetor de hemopatógenos que possuem relevância em clínica veterinária e em saúde pública (Walker *et al.*, 2000; Dantas-Torres *et al.*, 2006). De acordo com Szabó *et al.* (2005), *R. sanguineus* foi introduzido no Brasil durante o período colonial e apresenta forte associação com os cães, que constituem seus principais hospedeiros e as picadas em outros animais, inclusive seres humanos, são consideradas de caráter acidental, porém esse artrópode pode alcançar altas densidades populacionais em ambientes domiciliares e peridomiciliares habitados por cães (Labruna e Pereira, 2001; Guglielmone *et al.*, 2006), favorecendo infestações extensas em canis e até mesmo no interior das residências. Estudos recentes, baseados na designação de neótipo, na redescrição morfológica e na caracterização molecular, redefiniram a identidade taxonômica do complexo *R. sanguineus* sensu lato. Nesse contexto, a denominada “linhagem temperada”

passou a ser reconhecida como *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.) (Nava *et al.*, 2018), enquanto a “linhagem tropical” foi formalmente designada como *R. linnaei* (Audouin, 1826), sendo esta última a linhagem mais amplamente distribuída e frequentemente registrada em escala global (Šlapeta *et al.*, 2021; Šlapeta *et al.*, 2022). Evidências experimentais demonstram que apenas *R. linnaei*, anteriormente referida como a cepa tropical de *R. sanguineus* s.l., apresenta competência vetorial comprovada para a transmissão de *E. canis* em cães (Moraes-Filho *et al.*, 2015). Trata-se de uma espécie amplamente distribuída, presente em cães em todas as regiões do Brasil, sendo o principal vetor biológico de hemopatógenos para cães, incluindo os protozoários apicomplexos *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp., além das riquetsias dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*.

Dentre as espécies de ixodídeos de maior relevância para a saúde pública podemos citar *Amblyomma sculptum* e *A. aureolatum*, responsáveis pela transmissão da bactéria *Rickettsia rickettsii* - causadora da febre maculosa no país (Labruna *et al.*, 2017). No Brasil, *A. sculptum* é reconhecido como o principal vetor de *R. rickettsii* para o ser humano (Szabó *et al.*, 2013). Esse carrapato de hábito exófilo, é trioxeno (Guglielmone *et al.*, 2006) e em condições favoráveis completa um ciclo de vida por ano. É frequentemente encontrado em áreas com vegetação degradada, cerrado, matas ciliares e bordas de trilhas ou próximos a assentamentos humanos (Souza *et al.*, 2006). Já *A. aureolatum* é um carrapato neotropical de três hospedeiros, associado a regiões de Mata Atlântica na região Sudeste do país (Sabatini *et al.*, 2010). Os casos de febre maculosa brasileira em humanos relacionados a essa espécie de carrapato tendem a ocorrer quando cães entram em áreas de mata atlântica, são infestados por carrapatos adultos e, ao retornarem para o ambiente domiciliar, transportam esses ectoparasitos até as pessoas (Szabó *et al.*, 2013).

As bactérias do gênero *Mycoplasma* e o protozoário *Leishmania* spp. também figuram entre os agentes de grande relevância nas infecções que acometem cães. Todos esses gêneros de patógenos apresentam potencial zoonótico e veiculação vetorial bem descritas, sendo assim importantes tanto para medicina veterinária quanto humana. No entanto, a via vertical de transmissão é pouco elucidada. Essa realidade reforça a importância do conceito de Saúde Única, que reconhece a interdependência entre a saúde animal, humana e ambiental e também a necessidade de maiores estudos acerca dessa via alternativa de transmissão.

3.2 Principais hemopatógenos de cães

3.2.1 Família Anaplasmataceae

Os microorganismos da família Anaplasmataceae (Rickettsiales: Anaplasmataceae) são bactérias obrigatoriamente intracelulares que habitam os fagossomos das células hospedeiras e são potencialmente causadoras de doenças a humanos e animais (De Sousa *et al.*, 2017). Dentre as rickettsias endêmicas que acometem cães e são pertencentes a essa família, podemos citar as espécies *A. platys*, *A. phagocytophilum* e *E. canis*, sendo a terceira comprovadamente transmitida pelo carrapato *R. sanguineus* s. l. no Brasil (Groves *et al.*, 1975) e a primeira sugerida com detecção molecular do agente no vetor artrópode (Almeida *et al.*, 2012). A transmissão de *A. phagocytophilum* por essa espécie de carrapato ainda não foi confirmada, mas relatos associam o agente a infecções em mamíferos domésticos e silvestres no país (Silveira *et al.*, 2015, Silveira *et al.*, 2017).

No Brasil, *A. platys* é a rickettsia do gênero *Anaplasma* mais prevalente em infecções caninas, responsável por parasitar plaquetas e causar a enfermidade conhecida como trombocitopenia cíclica infecciosa (Gaunt *et al.*, 2010). Desde o primeiro relato em 1978, esse agente já foi descrito parasitando gatos, equinos, bovinos, caprinos, animais silvestres e humanos (Harvey *et al.*, 1978; Breitschwerdt *et al.*, 2014; Quorollo *et al.*, 2014).

Parasito com distribuição global, abrangendo África, Ásia, Oceania e Américas (Matei *et al.*, 2016; Barker *et al.*, 2012; Dyachenko *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2007), *A. platys* encontra-se amplamente distribuída no Brasil, sendo considerada endêmica, com taxas de prevalência que oscilam entre 4,1% e 17,2% na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Esses índices variaram conforme a área geográfica investigada, o perfil da população canina avaliada e o tipo de teste diagnóstico empregado, seja ele baseado em métodos diretos ou indiretos (Costa-Júnior *et al.*, 2013).

A infecção por essa rickettsia em cães, manifesta-se tipicamente por episódios recorrentes de trombocitopenia, que flutuam em ciclos de cerca de 10 a 14 dias durante a fase aguda da doença (Gaunt *et al.*, 2010); acredita-se que essa redução no número de plaquetas resulte da fagocitose mediada por macrófagos, ou pela opsonização através de anticorpos (De Tommasi *et al.*, 2014). Embora muitos animais permaneçam sem apresentar sinais clínicos evidentes nessa fase inicial, já foram descritas manifestações como letargia, diminuição ou perda do apetite, emagrecimento, febre, petéquias e episódios de epistaxe (Diniz e Aguiar, 2022).

A transmissão através do carrapato vetor *R. sanguineus* s.l é a principal via de veiculação tanto de *E. canis* quanto de *A. platys* (Almeida *et al.*, 2012; Moraes-Filho *et al.*, 2015).

Pertencente ao mesmo gênero, *A. phagocytophilum* é uma rickettsia intracelular de células granulocíticas, responsável pela anaplasmoose granulocítica humana (HGA) (Madewell e Gribble, 1982). Esse patógeno possui ocorrência mundial, e já foi identificado parasitando equinos, bovinos, cães, animais silvestres e seres humanos (Salvagni *et al.*, 2010; Stuen *et al.*, 2013; Silveira *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2015).

A soroprevalência desta hemobactéria em cães foi relatada em 55% na América do Norte e 50% na Europa (Beall *et al.*, 2008; Barutzki *et al.*, 2006). No Brasil, a frequência de soropositividade alcançou 42,8% na mesma espécie, na cidade de Belo Horizonte (Silveira *et al.*, 2017).

A patogenia da doença envolve imunossupressão funcional, que favorece infecções secundárias, e ativação da resposta inflamatória sistêmica com liberação de citocinas pró-inflamatórias. Esse mecanismo resulta em febre, leucopenia, trombocitopenia e manifestações clínicas como letargia, anorexia, dor articular, além de possíveis sinais respiratórios e neurológicos (Stuen *et al.*, 2013).

Anaplasma phagocytophilum é, prioritariamente, transmitido por carrapatos duros pertencentes ao complexo *Ixodes persulcatus*. Entretanto, no Brasil, os mecanismos de transmissão vetorial ainda não estão completamente esclarecidos, já que as espécies sabidamente vetores não possuem ocorrência no país. Santos *et al.*, (2011), observaram associação positiva entre carrapatos do gênero *Amblyomma* e *A. phagocytophilum*, indicando que esse artrópode pode estar ligado à transmissão desse agente. Silveira *et al.* (2017) relataram alta soroprevalência desta hemobactéria em cães na cidade de Belo Horizonte e identificaram apenas carrapatos da espécie *R. sanguineus* nos animais avaliados. Esses dados ressaltam a necessidade de investigações adicionais sobre a possível participação deste artrópode na transmissão vetorial do agente.

Ehrlichia canis, hemobactéria intracelular obrigatória de células mononucleares, é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC), uma enfermidade cosmopolita, de maior incidência em condições favoráveis para ocorrência e manutenção do vetor artrópode (Lewis *et al.*, 1977). Essa rickettsia já foi descrita parasitando canídeos silvestres, felinos domésticos e humanos (André, 2018; Oliveira *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 1996). Apresenta uma distribuição geográfica que se estende desde o Brasil até o México e alcança regiões do sul dos Estados Unidos, como a Flórida e o sul do Texas, áreas nas quais há relatos de alta

soropositividade (Qurollo *et al.*, 2014; Movilla *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2017). A prevalência de infecções por esse agente no Brasil é variável, com percentuais que vão de 7,8% na Bahia a 88% em São Paulo, conforme estudos que utilizaram detecção molecular como diagnóstico (Carvalho *et al.*, 2008; Dagnone *et al.*, 2009). A patogênese da doença inclui um período de incubação de oito a 20 dias, seguido de fases aguda, subclínica (assintomática) e crônica. E os sinais clínicos mais comuns durante as fases aguda ou crônica em cães naturalmente infectados são letargia, inapetência, anorexia, perda de peso, febre, epistaxe, petéquias, linfadenopatia e esplenomegalia, enquanto a anemia e a trombocitopenia são as alterações hematológicas mais comumente observadas (Diniz e Aguiar, 2022).

A combinação de mais de uma técnica é recomendada para otimizar o diagnóstico de hemoparasitoses de maneira geral, em seus diferentes estágios de infecção em animais domésticos (Kidd, 2019). Para a família *Anaplasmataceae*, a análise de esfregaços sanguíneos é um método comumente utilizado, mas possui sensibilidade e especificidade variável a depender da ricketsemia e da experiência do operador (Harrus e Waner, 2011). A sorologia é empregada principalmente como ferramenta de triagem; contudo, apresenta baixa especificidade, e já foram descritas reações cruzadas entre os membros da família (Carrade *et al.*, 2009). Por fim, métodos moleculares demonstram boa especificidade sobretudo quando testado diferentes materiais, mas baixa sensibilidade em infecções subclínicas ou crônicas nucleotídeos (Rodríguez-Alarcón *et al.*, 2020).

A terapia antimicrobiana como tratamento das infecções causadas pelos agentes da família *Anaplasmataceae*, deve ser pautada em diagnóstico laboratorial em associação a manifestações clínicas. A doxiciclina, na dose de 10mg/kg dia, continua sendo o antibiótico recomendado, e a duração do tratamento vai depender do agente etiológico e possíveis coinfeções. Além dos antibióticos, a terapia de suporte, como fluidoterapia, correção de eletrólitos e administração de hemoderivados, pode ser necessária (Diniz e Aguiar, 2022).

A prevenção mais eficaz de *Anaplasmataceae*s baseia-se no controle de vetores no animal e ambiente, isso inclui a redução da exposição aos carrapatos e uso de acaricidas (Ferrolo *et al.*, 2025). A triagem de potenciais doadores de sangue e de animais destinados à reprodução é importante, considerando também outras vias de transmissão dos agentes, como a transfusional e a vertical.

3.2.2 *Mycoplasma hemotrópico*

Inicialmente classificados com rickettsias pertencentes aos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, os Micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, foram posteriormente, através de estudos de sequenciamento do gene 16S rRNA, reclassificados dentro do gênero *Mycoplasma* (Micoplasmataceae: *Mycoplasma*) (Neimark *et al.*, 2001). São bactérias gram-negativas epieritrocitárias obrigatórias, que possuem ausência de parede celular e 0,3 a 1 µm de diâmetro. Em contraste com vários micoplasmas da mucosa, esses organismos nunca foram cultivados com sucesso (Biondo *et al.*, 2009).

Os hemoplasmas acometem uma grande diversidade de hospedeiros, abrangendo espécies como gatos, cães, roedores, suínos, bovinos, ovinos, equinos, morcegos, besouros e seres humanos. E diferentes espécies dessa bactéria já foram descritas pelo mundo. As principais espécies de hemoplasmas que acometem cães são *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (Tasker, 2020).

A prevalência dessas duas espécies é bastante variável. Tasker (2020) descreveu taxas mundiais que vão de 0,0% a 52,4% para *M. haemocanis* e 0,0% a 33,3% para *Ca. M. haematoparvum*, com base em resultados obtidos por PCR. O autor também observa que essa variação é influenciada por fatores como a distribuição geográfica, as condições clínicas individuais dos animais, o tipo de amostra coletada e a especificidade do método molecular empregado. A patogênese dos hemoplasmas caninos é pouco elucidada e a sintomatologia clínica mais comumente encontrada é anemia hemolítica, frequente em animais jovens ou imunossuprimidos (Do Nascimento *et al.*, 2012).

A conclusão acerca das diferentes vias de transmissão desses agentes ainda possui limitações. Embora a transmissão por vetores seja frequentemente mencionada, para hemoplasmas caninos, envolvendo artrópodes como pulgas, moscas e carrapatos (Seneviratna *et al.*, 1973; Assarasakorn *et al.*, 2012), os estudos disponíveis não são definitivos. A detecção de DNA do agente nesses ectoparasitos pode apenas indicar seu hábito hematófago, sem comprovar de forma conclusiva sua competência vetorial. A transfusão sanguínea é uma via comprovada de disseminação do agente (Gary *et al.*, 2006). Já a transmissão vertical e a transmissão indireta por agressão apresentam fortes indícios de eficácia na manutenção da infecção (Cannon *et al.*, 2016; Lashnits *et al.*, 2019).

As técnicas utilizadas para o diagnóstico de hemoplasmas são, em grande parte, semelhantes às empregadas na detecção de outros hemopatógenos. O diagnóstico direto por meio de esfregaço sanguíneo apresenta sensibilidade proporcional ao nível de bacteremia e especificidade que depende da experiência do examinador (Ghazisaeedi *et al.*, 2014). Já os

métodos moleculares oferecem alta especificidade, sendo que a capacidade de diferenciar espécies está relacionada à precisão dos primers utilizados (Peters *et al.*, 2008).

A compreensão ainda incompleta sobre as rotas de transmissão dos hemoplasmas em condições de campo torna difícil estabelecer orientações preventivas definitivas. No entanto, medidas como reduzir situações de agressão entre animais, adotar controle rigoroso de pulgas e carrapatos e realizar triagem molecular de doadores de sangue são recomendadas (Tasker, 2020).

3.2.3 *Babesia vogeli*

Pertencente ao gênero *Babesia*, a espécie *B. vogeli* (Apicomplexa: Piroplasmida) é o agente mais comum da babesiose canina no Brasil, embora já existam relatos, no sul do país, associados a *Babesia gibsoni* (Braccini *et al.*, 1992; Trapp *et al.*, 2006). Intraeritrocítico obrigatório, o protozoário já possui relato de parasitar, além de cães, gatos domésticos e animais selvagens (Palmer *et al.*, 2022; Javeed *et al.*, 2022). Tem distribuição mundial com relatos na Europa (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), África (Matjila *et al.*, 2004), e América (Rojas *et al.*, 2014; Criado-Fornelio *et al.*, 2007). No Brasil a prevalência de *B. vogeli* é variante oscilando, por exemplo, entre 0,9% no Maranhão e 22% no Pará (Moraes *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2015).

Em Belo Horizonte, Costa-Júnior *et al* (2012) encontrou 12,0% de prevalência em cães através de metodologias moleculares e Bastos *et al* (2004) relatou 42,0% de prevalência, em uma população suspeita para hemoparasitoses, tendo o esfregaço sanguíneo como método diagnóstico. A babesiose canina figura entre as principais doenças veiculadas por carrapatos que acometem cães no país, mas já foi relatada em outras espécies, incluindo roedores (de Sousa *et al.*, 2018). Seis espécies de *Babesia* foram identificadas parasitando humanos no mundo (Kumar *et al.*, 2021), evidenciando o potencial zoonótico e importância desse gênero para saúde humana, mas nenhum relato foi associado a *B. vogeli* até o momento.

A principal patogenia desse hemopatógeno inclui a invasão e destruição de glóbulos vermelhos, levando à anemia hemolítica que resulta da lise direta dos eritrócitos pela replicação dos parasitas intracelulares e por ligação de anticorpos à superfície celular promovendo hemólise combinada intravascular e extravascular (Adachi *et al.*, 1994 Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Embora anemia hemolítica grave possa ser encontrada em filhotes e animais imunossuprimidos, as infecções por *B. vogeli* são, frequentemente, leves ou subclínicas em comparação com outras espécies de *Babesia* e os sinais clínicos incluem febre, letargia, anorexia, icterícia (Solano-Gallego *et al.*, 2008). Vale ressaltar que outros fatores, como a idade

e o estado imunológico do hospedeiro e infecções ou doenças concomitantes, também desempenham um papel importante na patogênese da doença.

A transmissão vetorial de *B. vogeli* pelo carrapato *R. sanguineus* s.l. é bem elucidada pela literatura (Regendanz e Muniz, 1936; Irwin, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Paralelamente a isso, outras vias de veiculação devem ser levadas em conta, como por exemplo, a transfusão sanguínea e a transmissão transplacentária, esta última já descrita para outras espécies de *Babesia*, mas não para essa (Correa, 1974; Fukumoto *et al.*, 2005).

O diagnóstico para *B. vogeli* inclui métodos diretos, moleculares e sorológicos. A detecção do parasito em esfregaços sanguíneos apresenta alta especificidade, porém a sensibilidade está restrita a casos de moderada ou elevada parasitemia, além de depender da qualidade da coleta e coloração das lâminas (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Para as espécies de *Babesia* com tropismo visceral, como *B. vogeli*, recomenda-se a preparação de esfregaços utilizando sangue capilar, da ponta da orelha ou da cauda, onde a concentração parasitária tende a ser mais elevada (Bohm *et al.*, 2006). O diagnóstico molecular é amplamente indicado pela sua elevada sensibilidade e especificidade (Birkenheuer *et al.*, 2003). Já os métodos sorológicos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI, embora úteis como ferramenta complementar, podem apresentar reações cruzadas com outras espécies de *Babesia*, comprometendo a acurácia dos resultados (Vercammen *et al.*, 1995). Tecnologias emergentes, como sequenciamento de nova geração, abordagens ômicas, microfluídica, CRISPR, espectrometria de massa e inteligência artificial, estão revolucionando o diagnóstico da babesiose ao permitir detecção rápida, sensível e multipatógeno, melhor caracterização da patogênese e maior eficiência na vigilância epidemiológica e no manejo clínico (Jia *et al.*, 2025).

O tratamento da infecção por *B. vogeli* consiste na aplicação subcutânea de dipropionato de imidocarb, na dose de 5, 7,5 mg/kg, com repetição após 14 dias, e as estratégias de controle concentram-se, principalmente, na redução da infestação pelo carrapato vetor, por meio da aplicação de produtos formulados com diversas substâncias, como permetrina, amitraz, fipronil, imidaclopride, fluralaner, entre outras (Otranto *et al.*, 2010). Outra estratégia fundamental de controle consiste no rastreamento regular dos cães doadores de sangue, medida recomendada para prevenir a transmissão transfusional (Wardrop *et al.*, 2005).

3.2.4 *Hepatozoon canis*

Igualmente pertencente ao filo Apicomplexa, o agente, intraleucocitário, *Hepatozoon canis* (Hepatozoidae: *Hepatozoon*), é o protozoário responsável pela hepatozoonose canina

(Irwin, 2002). A espécie já foi descrita parasitando roedores, outros carnívoros, como o gato, o chacal e a hiena e cachorro do mato (Soulsby, 1982; Alencar *et al.*, 1997), mas não humanos. Relatada na África, Ásia, Europa e América do Norte e do Sul (Baneth *et al.*, 2003), essa é a única espécie dentro do gênero *Hepatozoon* descrita parasitando cães no Brasil (Rubini *et al.*, 2005; Paludo *et al.*, 2005).

A prevalência de infecção canina por esse protozoário variou entre diferentes regiões do Brasil, com o menor índice registrado em São Paulo (5,9%) por meio da PCR como método diagnóstico, e o maior no Rio de Janeiro, onde foi observado um percentual de 39,2% utilizando técnica de diagnóstico direto (O'Dwyer *et al.*, 2001; O'Dwyer *et al.*, 2004).

Responsável pela hepatozoonose canina, esse agente costuma provocar uma forma mais branda da doença, que acomete principalmente o baço, os linfonodos e a medula óssea, levando ao desenvolvimento de anemia e episódios de letargia (Baneth & Weigler, 1997).

O principal vetor da doença no Brasil, são os carrapatos *R. sanguineus* s.l e *Amblyomma ovale*, e a transmissão para vertebrados ocorre através da ingestão desse hospedeiro, invertebrado, infectado (Smith, 1996; Baneth *et al.*, 2001). A infecção por *H. canis* é frequentemente diagnosticada por meio da análise de esfregaço sanguíneo e a PCR para o agente tem se demonstrado uma técnica de diagnóstico sensível (Criado-fornelio *et al.*, 2003). Os testes sorológicos podem ser ferramentas úteis, porém sua utilização no Brasil é limitada, pois os antígenos empregados nesses métodos são provenientes de cães com níveis elevados de parasitemia, uma condição rara na população canina brasileira (O'Dwyer, 2011).

O tratamento principal da hepatozoonose canina por *H. canis* consiste na aplicação subcutânea de dipropionato de imidocarb, na dose de 6–6,6 mg/kg, com repetição após 14 dias para melhor eficácia (O'Dwyer, 2011). As estratégias de controle visam a diminuição da infestação pelo vetor.

3.2.5 *Leishmania infantum*

Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), é um protozoário intracelular de células fagocíticas do sistema mononuclear, responsável pela leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose visceral canina (LVC) na América do Sul, no Mediterrâneo, na Europa e na Ásia Ocidental e Central (Serafim *et al.*, 2020). Esse protozoário é capaz de parasitar uma ampla diversidade de mamíferos selvagens e domésticos pelo mundo (Tsakmakidis *et al.*, 2024), e foi introduzido nas Américas durante a colonização europeia, estando presente de forma endêmica em praticamente todas as regiões do Brasil, com exceção

da região Sul, onde os casos são raramente identificados (Chagas *et al.*, 1938; de Freitas Milagres *et al.*, 2023).

A prevalência da doença no país é variável, chegando a 67%, sorologicamente relatados, em áreas endêmicas (Silva *et al.*, 1997). Os hospedeiros primários são humanos e canídeos, sendo os cães domésticos os principais reservatórios do parasito (Serafim *et al.*, 2020). A leishmaniose visceral em Belo Horizonte apresenta elevada relevância epidemiológica por exemplificar o processo de urbanização de uma zoonose historicamente associada ao ambiente rural. Evidências indicam que a epidemia canina precedeu temporal e espacialmente os casos humanos, reforçando o papel dos cães como importantes sentinelas epidemiológicas e reservatórios na dinâmica de transmissão (Bevilacqua *et al.*, 2001).

De acordo com Dantas-Torres (2008), o principal vetor de *L. infantum* no Brasil é o flebotomíneo *L. longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e a transmissão se dá através do repasto sanguíneo das fêmeas infectadas. No entanto, as vias transfusional e transplacentária também já foram descritas e merecem atenção especial (da Silva *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2016), sobretudo em regiões onde a presença do vetor é limitada ou ausente. Em humanos, a doença também chamada de calazar, é frequentemente letal quando não é feito tratamento adequado. Apresenta-se com febre intermitente, emagrecimento, aumento do baço, do fígado e/ou dos linfonodos, além de anemia (Desjeux, 2004). Em cães a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma enfermidade sistêmica de apresentação clínica inespecífica, capaz de acometer diversos órgãos e tecidos. Entre os sinais mais característicos destacam-se lesões cutâneas, linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, letargia, anorexia, esplenomegalia, poliúria, polidipsia, manifestações oculares, epistaxe, crescimento exagerado das unhas, claudicação, vômitos e artrite (Baneth *et al.*, 2008).

Os métodos diagnósticos, mais usuais, incluem a detecção de amastigotas em esfregaços corados de sangue total em EDTA, aspirados de lesões cutâneas, linfonodos, medula óssea e baço, análise molecular de swab oftálmico e de lesões de pele, além de identificação de anticorpos séricos específicos contra *Leishmania* por diferentes métodos sorológicos, combinações de técnicas diretas e indiretas e comprovação da presença do DNA parasitário por meio de técnicas moleculares (Paltrinieri *et al.*, 2010; Mehrotra *et al.*, 2025).

No Brasil o principal tratamento utilizado para LVC consiste na combinação de miltefosina com alopurinol como (Miró *et al.*, 2018). E a prevenção eficaz contra picadas de flebotomíneos envolve eliminar ambientes favoráveis aos flebotomíneos ao redor das residências, aplicar inseticidas no ambiente e utilizar produtos tópicos com eficácia comprovada contra esses insetos (Marcondes & Rossi, 2013).

Considerando a diversidade de hemopatógenos de importância clínica e epidemiológica em cães, a literatura descreve diferenças relevantes entre agentes quanto à via clássica de transmissão, ao perfil clínico e ao nível de evidência disponível para transmissão vertical. Em termos de Saúde Única, essa heterogeneidade é particularmente importante na interpretação de infecções em cadelas gestantes e neonatos, uma vez que a manutenção de agentes infecciosos pode ocorrer por mecanismos distintos daqueles tradicionalmente atribuídos à transmissão vetorial. Assim, o Quadro 1 sistematiza os principais agentes investigados nesta dissertação, sintetizando sua relevância em medicina veterinária, a plausibilidade de transmissão vertical e a implicação analítica de cada um para a interpretação dos achados moleculares e hematológicos.

Quadro 1 - Comparação dos hemopatógenos caninos investigados quanto à via de transmissão, relevância clínica e evidência de transmissão vertical

Agente	Classificação biológica	Via clássica de transmissão / vetor principal	Relevância clínica em cães (síntese)	Evidência de transmissão vertical em cães	Força da evidência para via vertical*	Implicação para a presente dissertação
<i>Ehrlichia canis</i>	Bactéria intracelular (Anaplasmataceae)	Vetorial por <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	Trombocitopenia, anemia e manifestações sistêmicas com curso agudo ou crônico	Detecções moleculares em amostras maternas e neonatais em estudos observacionais	Moderada	Sustenta investigação em sangue materno, placenta, natimortos e neonatos, com interpretação inferencial prudente
<i>Anaplasma platys</i>	Bactéria intracelular (Anaplasmataceae)	Vetorial, associada principalmente a <i>R. sanguineus</i> s.l.	Trombocitopenia cíclica e alterações hematológicas variáveis	Evidência molecular sugestiva, porém heterogênea entre desenhos e amostras	Baixa a moderada	Relevante para avaliação de coinfeções e alterações hematológicas maternas
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Bactéria intracelular (Anaplasmataceae)	Vetorial por carrapatos do complexo <i>Ixodes</i> (dependente da região)	Sinais sistêmicos inespecíficos e alterações hematológicas	Evidência vertical em cães ainda escassa e inconsistente	Baixa	Resultado não detectado deve ser discutido como ausência de detecção na população estudada
<i>Babesia vogeli</i>	Protozoário intraeritrocitário	Vetorial por <i>R. sanguineus</i> s.l.	Anemia hemolítica, letargia e gravidade variável	Há relatos e achados moleculares compatíveis com transmissão vertical em contextos específicos	Moderada	Alta relevância para discussão perinatal e manutenção do agente sem vetor
<i>Hepatozoon</i> spp.	Protozoário (Apicomplexa)	Ingestão de carrapato infectado (via principal)	Febre, alterações musculares e hematológicas	Evidência de via vertical em cães é limitada	Baixa	Negatividade molecular deve considerar a particularidade biológica da transmissão clássica
Hemoplasmas (<i>Mycoplasma</i> hemotrópicos)	Bactérias hemotrópicas	Vetorial e não vetorial (possibilidade iatrogênica; vertical em investigação)	Anemia regenerativa, sobretudo em coinfeções/ imunossupressão	Evidências moleculares de transmissão vertical descritas, com variação metodológica	Moderada	Fundamenta análise integrada com achados hematológicos gestacionais
<i>Leishmania infantum</i>	Protozoário (Trypanosomatidae)	Vetorial por flebotomíneos (via clássica)	Doença multissistêmica (relevância veterinária e em Saúde Única)	Literatura descreve transmissão vertical em cães, com variação no grau de demonstração direta	Moderada	Importante para vigilância reprodutiva e discussão de manutenção enzoótica

Fonte: Autora (2026). (*) Força da evidência para via vertical em cães: Baixa = evidência pontual/indireta, com pouca consistência entre estudos; Moderada = recorrência de achados moleculares, porém com limitações de delineamento para inferência causal definitiva; Alta = consistência robusta entre estudos, temporalidade rigorosa e exclusão sistemática de rotas alternativas

3.3 Composição placentária e aspectos fisiológicos da gestação e da imunidade

3.3.1 Placenta Canina

A placenta exerce papel central como estrutura de ligação entre a mãe e o embrião/feto em desenvolvimento. Durante a gestação, ela é responsável por diversas funções essenciais, como a fixação do concepto ao endométrio, a modulação da resposta imunológica materna, a realização das trocas metabólicas, a produção de hormônios e o estabelecimento de uma barreira protetora frente a xenobióticos e agentes infecciosos (Liempi *et al.*, 2020).

A placenta canina é classificada como endoteliocorial zonária. Sua estrutura inclui uma faixa em forma de cinturão ao redor do feto (zona do labirinto), hematomas marginais e o âmnio (Kowalewski *et al.*, 2021). Esse tipo de placenta apresenta um grau moderado de invasão nos tecidos maternos, pois o trofoblasto se estende apenas até o endotélio dos vasos maternos, sem comprometer diretamente os capilares nem invadir profundamente as células decíduais (Anderson, 1969), uma invasão controlada do tecido fetal, suficiente para permitir trocas materno-fetais eficientes, mas sem a destruição ampla dos tecidos uterinos maternos.

A proximidade na interface materno-fetal favorece a troca de nutrientes e permite a fagocitose de glóbulos vermelhos maternos (eritrofagocitose) pelas células trofoblásticas; particularmente nas áreas hematófagas da placenta, um exemplo desses mecanismos é a captação de ferro na zona hematófaga marginal desse tipo de placenta (Oliveira *et al.*, 2012). Esse processo de fagocitose de células maternas pelos trofoblastos fetais tem sido apontado como uma possível via de transmissão transplacentária de patógenos (Latrofa *et al.*, 2016).

3.3.2 Imunotolerância Celular

Durante a gestação, o sistema imunológico da cadela passa por adaptações para evitar a rejeição do feto, que é parcialmente “estranho” ao organismo materno, ao mesmo tempo em que mantém a defesa contra infecções. O início da gestação é marcado por um aumento de sinais pró-inflamatórios moderados no útero, facilitando a implantação do embrião (Tavares Pereira *et al.*, 2021). Durante a fase de implantação (Figura 1) e invasão inicial do trofoblasto, observa-se um aumento no recrutamento de macrófagos e células *Natural Killer*'- NK uterinas (Brown *et al.*, 2014), que atuam como reguladoras centrais do processo, mediando a profundidade da invasão, a angiogênese e o reparo tecidual. Essa ativa remodelação endometrial é essencial para estabelecer a imunotolerância e prevenir a rejeição do concepto.

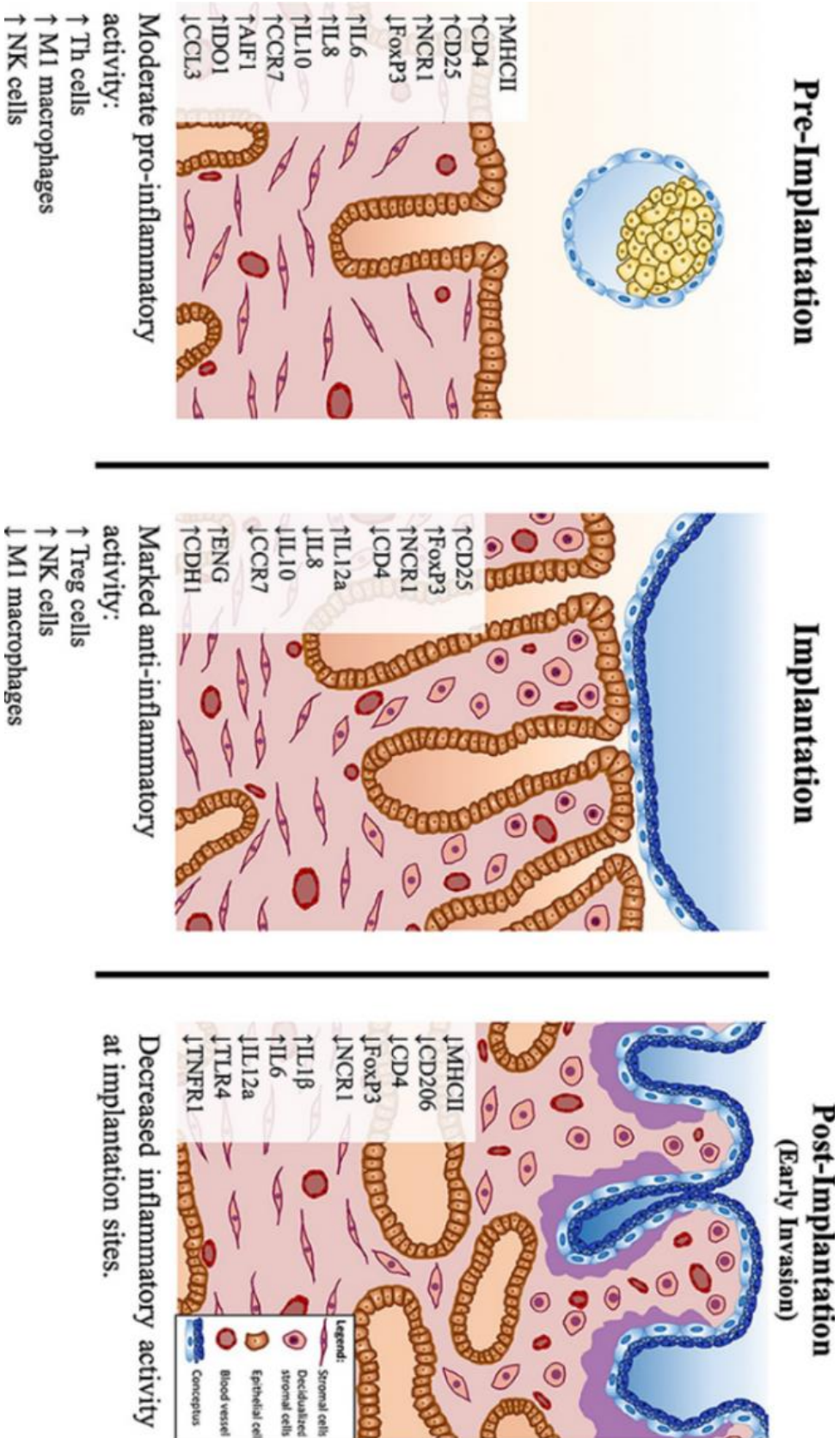
A presença de células T reguladoras indica uma supressão das respostas imunes ao embrião invasor. A placenta funciona como primeira barreira, separando os sistemas sanguíneo e linfático de mãe e feto, impedindo o movimento de células do sistema imune para dentro e

para fora dos tecidos. Após a implantação, ocorre uma modulação na expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I), essenciais para o reconhecimento imunológico. Nesse estágio, observa-se uma redução na atividade de linfócitos T citotóxicos locais, o que indica um estado de imunossupressão seletiva em resposta à invasão embrionária (Hori *et al.*, 2003). Adicionalmente, o suporte hormonal, mediado principalmente pela progesterona e pelo estradiol, desempenha um papel fundamental na manutenção da gestação promovendo imunotolerância e potencializando a vascularização uterina e a sensibilidade dos receptores hormonais, garantindo coletivamente o ambiente necessário para a viabilidade fetal.

3.3.3 Modulação Hormonal

A progesterona regula a resposta imune materna, induzindo o predomínio de citocinas Th2 e a produção de PIBF (fator de bloqueio induzido por progesterona), que reduzem a atividade citotóxica das células NK e favorecem a tolerância ao feto. Além disso, esses hormônios estimulam o desenvolvimento uterino, a implantação trofoblástica e a formação placentária (Feliciano *et al.*, 2012). Junto com citocinas e células regulatórias, criam um ambiente imunológico controlado que permite o desenvolvimento gestacional e previne rejeição imunológica ao feto. A Figura 1 retrata e resume de maneira ilustrativa essa regulação inicial por meio de células e citocinas.

Figura 1. Avaliação de marcadores específicos durante os estágios iniciais da gestação canina.



Fonte: Tavares Pereira *et al.*, (2021)

Embora os cães apresentem uma placenta endoteliocorial com formação de decídua (Tavares Pereira *et al.*, 2021), os mecanismos imunológicos envolvidos na gestação ainda não estão plenamente esclarecidos nessa espécie, e a composição do sistema imunológico placentário permanece pouco estudada. As particularidades do processo de decidualização canina também limitam a aplicação direta de conhecimentos obtidos em outras espécies para essa. Rueda *et al.* (2024), enfatiza que o estado de imunossupressão celular durante a gestação, pode tornar a cadela mais vulnerável a infecções e neoplasias que dependem da imunidade celular para defesa.

Embora pequenas quantidades de imunoglobulinas (principalmente IgG) possam atravessar a placenta em cães, essa transferência transplacentária é restrita em razão do tipo placentário endoteliocorial, que impõe barreira parcial à passagem de macromoléculas. Assim, a principal via de aquisição de imunidade passiva na espécie ocorre por meio da absorção enteral de imunoglobulinas presentes no colostro, durante a chamada janela de permeabilidade intestinal neonatal, que se estende aproximadamente pelas primeiras 24 a 48 horas pós-parto. Nesse período, os enterócitos imaturos permitem a internalização não seletiva de imunoglobulinas intactas; após o “fechamento intestinal”, essa capacidade é drasticamente reduzida (Chastant e Mila, 2019).

Esse aspecto fisiológico é crucial para a interpretação da positividade sorológica em neonatos, uma vez que a detecção de anticorpos nas primeiras semanas de vida pode refletir transferência passiva colostrar, e não infecção congênita. Portanto, a consideração da janela de permeabilidade intestinal e do momento da coleta é fundamental para distinguir transmissão pré-natal (transplacentária) de exposição ou aquisição pós-natal, permitindo inferências mais acuradas sobre a temporalidade da infecção.

3.4 Transmissão não vetorial de agentes patogênicos

Os primeiros relatos de infecções congênitas em mamíferos surgiram por volta dos anos 1800, quando foram documentados casos de varicela transmitida de mãe para filho em humanos (Laforet e Lynch, 1947). A transmissão vertical de patógenos corresponde ao processo pelo qual o agente infeccioso é transferido da fêmea gestante para seus descendentes, seja durante o desenvolvimento intrauterino por via transplacentária, no canal do parto ou após o nascimento, durante o período de amamentação (Jasik *et al.*, 2015).

3.4.1 Transmissão via cópula

Na Medicina Veterinária, a transmissão via cópula de patógenos transmitidos por vetores (VBPs) tem sido relatada em cães e diversas outras espécies (Metcalf *et al.*, 2001; Ruiz-Fons *et al.*, 2014; Valle *et al.*, 2022).

Silva *et al.* 2009, confirmaram a ocorrência de transmissão venérea de *Leishmania* spp. em seis cadelas previamente livres do protozoário, que adquiriram a infecção após a cópula com machos positivos, os quais eliminaram o agente no sêmen. No estudo, os autores asseguraram a ausência do vetor biológico, reforçando que a infecção ocorreu exclusivamente por via sexual.

3.4.2 Transmissão Lactogênica

A transmissão vertical por meio do aleitamento também tem sido objeto de investigação. Lombardi *et al.* (2025) identificaram 22,12% de positividade para hemopatógenos no colostro de vacas naturalmente infectadas em Minas Gerais, Brasil. No entanto, os autores alertam que a detecção de DNA não comprova, necessariamente, a viabilidade dos agentes ou sua capacidade de infectar os bezerros. Relatos semelhantes já foram descritos para *Trypanosoma vivax* em cabras e *Anaplasmas* pp. em pequenos ruminantes (Zhang *et al.*, 2016; Bezerra *et al.*, 2023). Em cães, já foram comprovados casos de infecção lactogênica por *Toxocara canis* e *Ancylostoma caninum*; entretanto, não há registros de transmissão comprovada por hemopatógenos por essa via em canídeos, embora exista a possibilidade de *L. infantum* ser excretada no leite materno (Burke *et al.*, 1985; Ribeiro *et al.*, 2022).

3.4.3 Transmissão transplacentária (intrauterina)

Paralelamente, a transmissão vertical de hemopatógenos por via placentária tem recebido crescente atenção, com relatos cada vez mais frequentes de infecções congênitas em várias espécies, incluindo ovinos, bovinos, animais silvestres e cães (Chisu *et al.*, 2021; Andrade *et al.*, 2024; Millán *et al.*, 2024; Pereira *et al.*, 2025). Os mecanismos envolvidos na transmissão transplacentária de hemopatógenos ainda não estão plenamente definidos e requerem investigações adicionais. No entanto, Jasik *et al.* (2015) destacam a relevância dessa via na epidemiologia dessas doenças, ressaltando seu papel na disseminação de agentes patogênicos entre gerações, mesmo na ausência do hospedeiro definitivo.

Nesse contexto, o delineamento metodológico desta dissertação foi estruturado para produzir evidências moleculares consistentes de transmissão vertical por meio da análise complementar de diferentes matrizes biológicas. A avaliação da placenta permite investigar diretamente a interface materno-fetal e a possível ocorrência de infecção transplacentária. A análise de pools de órgãos de natimortos possibilita inferir disseminação sistêmica intrauterina, reforçando a hipótese de infecção estabelecida ainda durante a gestação. Por sua vez, a escolha

do sangue total de neonatos com até cinco dias de vida fundamenta-se na busca por detecção molecular em período anterior ao intervalo de incubação conhecido para os hemopatógenos investigados, reduzindo a probabilidade de que a positividade decorra de infecção adquirida pós-natalmente. Dessa forma, a estratégia amostral adotada fortalece a inferência temporal e biológica da via vertical como mecanismo plausível de infecção.

3.5 Alterações hematológicas em cadelas gestantes

O tempo de gestação em cadelas pode oscilar entre 57 e 72 dias, abrangendo o período desde a primeira cópula até o momento do parto. Esse tempo pode variar de acordo com fatores como raça e tamanho da ninhada (Concannon *et al.*, 1986; Johnson, 2008). Anormalidades nos parâmetros hematológicos de cadelas durante a gestação podem predispor a distúrbios fisiológicos e metabólicos, como anemia, hipertensão, parto prematuro e baixo peso ao nascer (Kockaya, 2019). Por esse motivo, o monitoramento desses parâmetros ao longo da gravidez é fundamental para assegurar uma gestação saudável e favorecer o adequado desenvolvimento fetal.

Kockaya (2019), relatou variações hematológicas relevantes em cadelas gestantes e não gestantes da mesma raça. Os valores de hemoglobina (HGB), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) apresentaram reduções significativas em fêmeas da raça Pastor Kangal durante a gestação, sendo esse achado atribuído pelo autor ao aumento do volume plasmático e à redução dos níveis de hemoglobina decorrente de deficiência de ferro. Estudos em humanos também observaram diminuição das concentrações séricas de ferro em cadelas prenhes, sugerindo que essa alteração estaria relacionada ao uso das reservas corporais do mineral para o desenvolvimento fetal e a manutenção da placenta (Milman *et al.*, 2000). No estudo citado, os níveis de ferro nas cadelas gestantes foram discretamente inferiores aos observados nas não gestantes. Entretanto, como limitação, o estudo não mencionou qualquer investigação sobre a presença de possíveis agentes patogênicos, incluindo hemopatógenos, nas cadelas avaliadas.

De Cramer *et al.*, (2016), analisaram 324 cadelas saudáveis no período pré-parto e obtiveram uma média de hematócrito de 44,2%. Desta forma, entende-se que cadelas gestantes com valores abaixo da faixa de referência devem ser investigadas quanto à presença de doenças concomitantes potencialmente associadas ao desenvolvimento de anemia. Além disso, outros estudos recomendam que o hematócrito se mantenha dentro dos valores de referência, e que qualquer grau de anemia em cadelas prenhes deve ser criteriosamente avaliado para a detecção de possíveis doenças subjacentes (Dimço *et al.*, 2013). Portanto, compreender a patogênese e as implicações dessas infecções durante a gestação podem auxiliar na implementação de

medidas preventivas e no diagnóstico precoce de possíveis doenças nesses animais. Dessa forma, a avaliação hematológica deve ser interpretada como componente complementar ao diagnóstico molecular, contribuindo para a compreensão clínica materna no período gestacional e periparto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

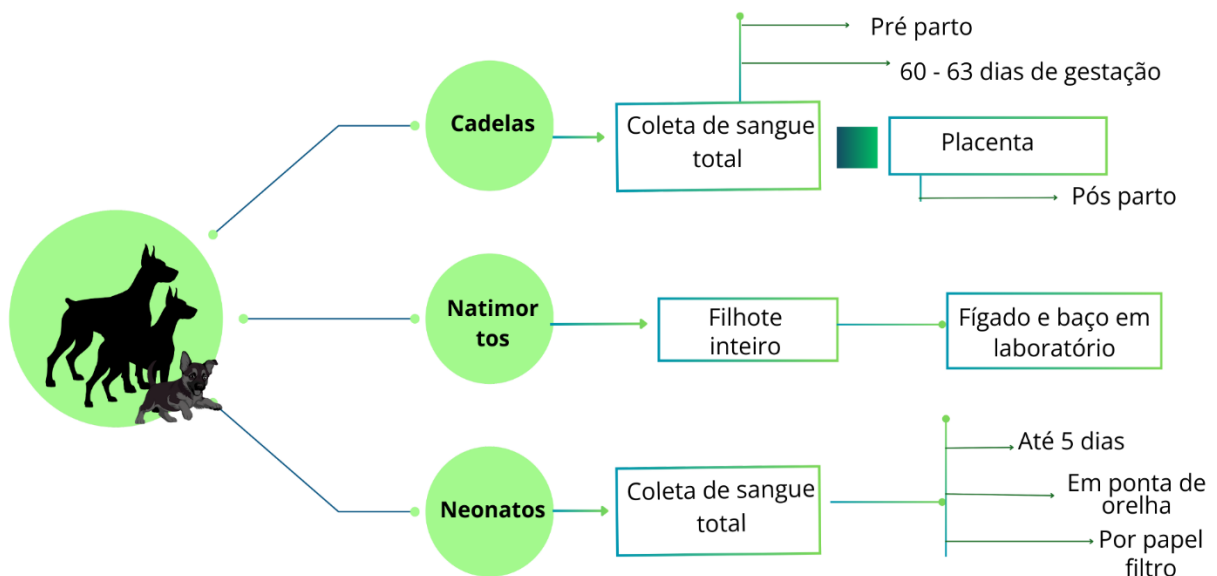
Trata-se de um estudo observacional prospectivo, conduzido entre março e dezembro de 2024, com acompanhamento de cadelas gestantes naturalmente expostas e avaliação de amostras maternas, placentárias e neonatais para investigação de evidências moleculares de transmissão vertical de hemopatógenos.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o protocolo 206/2024.

4.1 Área de estudo, coleta de amostras e laudos.

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas de cadelas gestantes atendidas em um hospital veterinário localizado na região da Pampulha em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (Figura 2). Foram incluídas no estudo fêmeas submetidas a acompanhamento clínico e/ou ultrassonográfico no período periparto e que, posteriormente, foram encaminhadas à realização de cesariana no centro cirúrgico da própria instituição. Não houve restrição quanto à raça ou à idade dos animais. Foram excluídos aqueles submetidos a parto eutócico (via vaginal), bem como os que não apresentavam exames laboratoriais e avaliação pré-anestésica devidamente registrados. A cesariana constitui um procedimento de rotina na instituição, sendo frequentemente indicada em função de predisposições raciais, ocorrência de distocia, histórico reprodutivo desfavorável ou como medida preventiva para redução de riscos materno-fetais. O hospital veterinário é referência no atendimento de fêmeas gestantes, dispondo de uma ala de maternidade especificamente estruturada para o acompanhamento pré-natal, monitoramento periparto (Figura 3 – A, B, C) e assistência neonatal (Figura 4 – A, B).

Figura 2: Descrição dos materiais coletados no estudo.



Todos os animais encontravam-se clinicamente estáveis, sem histórico recente de comorbidades ou alterações que contraindicassem o procedimento cirúrgico. As coletas foram realizadas entre março e dezembro de 2024. Mediante a obtenção do consentimento informado dos proprietários (Anexo 1), 51 cadelas prenhes, de diferentes idades e raças, foram incluídas neste estudo. A coleta de sangue foi realizada no período pré-parto por punção da veia jugular, utilizando tubos a vácuo estéreis contendo EDTA e tubos sem anticoagulante. As análises hematológicas foram conduzidas em laboratório interno do hospital, imediatamente após a coleta, incluindo hemograma completo, com determinação da contagem total de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, índices eritrocitários (VCM, HCM e CHCM), contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas.

Para fins de diagnóstico molecular, foram coletadas 40 amostras de sangue total de neonatos vivos de até cinco dias de vida, por punção na ponta da orelha com lancetas descartáveis. O sangue foi depositado em papel filtro específico, com um ou mais cartões por filhote, e posteriormente acondicionado em microtubos tipo *Eppendorf* e individualmente identificados com o nome da mãe e a numeração correspondente à coleta.

Durante as cesarianas, 51 placentas e 22 filhotes natimortos foram individualmente acondicionados em sacos plásticos, devidamente identificados com o nome da cadela e a data da coleta, e armazenadas a -20°C .

Posteriormente, essas amostras foram transportadas em caixa térmica ao Laboratório de Protozoologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - Protovet, onde

permaneceram sob as mesmas condições de temperatura até o processamento laboratorial.

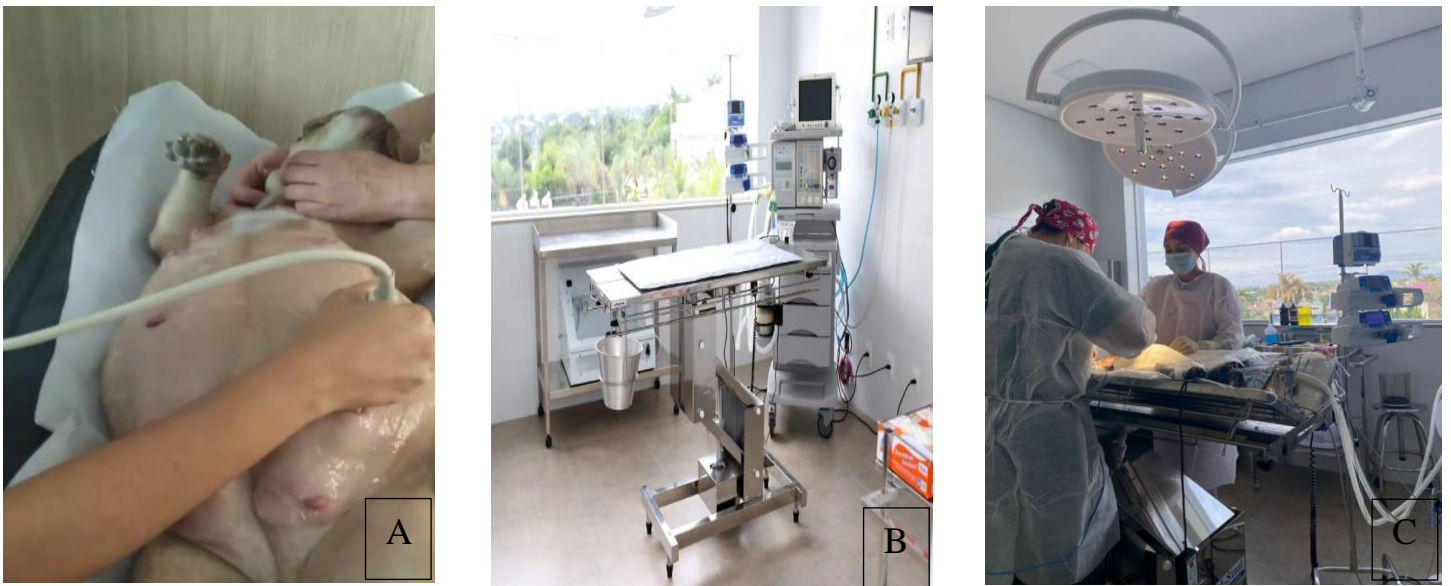


Figura 3: Hospital veterinário onde ocorreram a coleta das amostras: (A) Cadela prenhe sendo avaliada por ultrassonografia; (B) Ambiente cirúrgico equipado para procedimento de cesariana; (C) Realização de cesariana com suporte neonatal imediato.

As coletas de órgãos de natimortos e armazenamento de amostras foram realizadas no laboratório Protovet (Figura 4 – C, D, E). Para cada filhote, com o uso exclusivo de bisturi, par de luvas estéreis e superfície laminada individual, foi obtido um pool de tecidos (fígado e baço), armazenado em tubos do tipo Falcon estéreis de 15 mL. Da mesma forma, segmentos das placentas, principalmente zona hematófaga, foram coletados separadamente para cada cadela, também sob condições estéreis. Todas as amostras foram devidamente armazenadas a -20°C até o momento da extração do material genético.





Figura 4: (A e B) Ala de maternidade do hospital veterinário onde, após a realização das cesarianas, as mães e seus filhotes permanecem em observação. O ambiente era monitorado, limpo e equipado com incubadoras para suporte neonatal, apresentando condições desfavoráveis à presença de ectoparasitos. (C) Tubos tipo Falcon utilizados para acondicionar fragmentos placentários armazenados após a segregação realizada no laboratório Protovet. (D) Filhote natimorto aguardando o processo de descongelamento para posterior segregação do *pool* de órgãos. (E) Papel filtro impregnado com sangue de neonato vivo, obtido por punção auricular, de acordo com Samsonova *et al.* (2022).

4.2 Análises Estatísticas

O N amostral foi indicado pela proporção estimada de amostras positivas para cada agente (valores entre 0 e 100 %), de acordo com metodologia baseada na distribuição binomial. O universo da população amostrada foi de 51 indivíduos adultos, de forma que a estimativa considerou a população de tamanho infinito, utilizando-se a fórmula abaixo.

$$n = \frac{Z_{(\alpha/2)}^2 * P * (1-P)}{d^2}$$

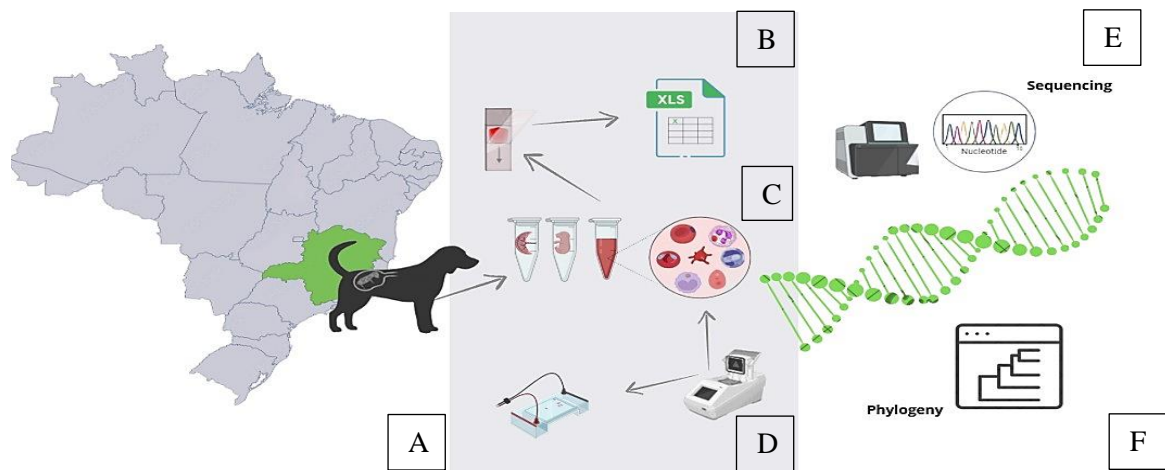
Em que: n é o número amostral mínimo estimado; $Z_{(\alpha/2)}$ é o quartil superior da distribuição Normal Padrão que deixa uma probabilidade igual a $\alpha/2$ na cauda direita; P é o nível de significância, onde para um valor de $P = 0.05$, o valor de $Z_{(\alpha/2)}$ é igual a 1,96, e P é o valor pré-definido da proporção esperada; d é uma estimativa do erro máximo assumido, sendo que para um erro igual a d, o intervalo de confiança teve tamanho de 2d. Valores pequenos de d indicam alta precisão (intervalo de confiança estreito) e, portanto, elevado número amostral.

A análise descritiva dos dados relacionados à pesquisa de hemopatógenos em amostras de sangue, placenta, *pools* de órgãos e sangue dos neonatos foi realizada em Excel® (versão 2019), e foi representada por percentual de animais positivos e negativos para todos os agentes pesquisados e percentual de coinfeccções.

4.3 Análises Laboratoriais

Todas as análises moleculares foram conduzidas no laboratório de Protozoologia Veterinária - Protovet, EV-UFMG (Figura 5).

Figura 5: Desenho esquemático das análises laboratoriais envolvidas na metodologia da pesquisa. (A) Coletas realizadas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; (B) Amostra para pesquisa direta, em esfregaço de hemoparasitos; (C) Materiais para pesquisa, de hemopatógenos, por análise molecular; (D) Termociclador e Cuba de eletroforese para realização da metodologia molecular; (E) Sequenciamento genético dos resultados moleculares; (F) Análise filogenética do sequenciamento.



Fonte: elaborado pelo autor (2026).

4.3.1 Análise hematológica

Resultados dos exames hematológicos, pré cirúrgicos, das cadelas foram obtidos a partir de amostras de sangue total colhidos, no pré-parto, em EDTA. As análises foram executadas, em até 30 minutos após a coleta, no analisador automático *IDEXX ProCyte One* e a leitura foi confirmada de acordo com os valores de referência adotados e descritos por Jain (1993). Amostras de sangue fresco acondicionadas em tubo contendo EDTA como anticoagulante foram utilizadas para exame parasitológico por meio de esfregaços sanguíneos submetidos e amostras coaguladas e hemolisadas não foram incluídas no estudo.

4.3.2 Esfregaço sanguíneo

Após coloração com Panótico Rápido®, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ei (Nikon Corporation, Tóquio, Japão), sob aumento de 1000× (objetiva de 100× com uso de óleo de imersão). Como critério operacional de leitura, foram avaliados, no mínimo, 50 campos microscópicos por lâmina, distribuídos desde a região da franja até o corpo médio do esfregaço, priorizando áreas com adequada monocamada celular e evitando regiões de sobreposição. Considerou-se resultado positivo a visualização inequívoca de estruturas compatíveis morfológicamente com hemopatógenos aderidas ou associadas às hemácias, em pelo menos um campo analisado.

A leitura foi realizada de forma independente por dois avaliadores, sendo o segundo observador cego quanto aos dados clínicos e aos resultados moleculares, com o objetivo de reduzir viés observacional. Nos casos classificados como inconclusivos, seja por artefatos, baixa qualidade do esfregaço ou dúvida morfológica, foi realizada nova leitura da lâmina por um terceiro observador.

4.3.3 Extração de DNA - amostras de sangue total em EDTA das cadelas

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente (25 °C). A extração de DNA a partir de sangue total em EDTA foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, São Paulo, Brasil), conforme as recomendações do fabricante para 300 µL de sangue total como input por amostra.

O DNA extraído foi eluído em solução nuclease-free fornecida pelo kit e armazenado a -20 °C até a realização das análises moleculares. A concentração e a pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria, considerando-se aceitáveis amostras com concentração mínima de 10 ng/µL e máxima 80ng/ µL e razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0. Amostras fora desses parâmetros foram submetidas a nova extração antes da inclusão nas reações de PCR.

4.3.4 Extração de DNA - amostras de placentas e *pools* de órgãos

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente (25 °C). Para cada extração, foram utilizados aproximadamente 25 mg de tecido (placenta ou pool de órgãos). O DNA foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, São Paulo, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante para tecidos animais.

O DNA foi eluído em solução nuclease-free e armazenado a -20 °C. A concentração e a pureza foram determinadas por espectrofotometria, adotando-se como critérios de inclusão nas reações de PCR concentração mínima de 10 ng/µL e máxima 80ng/ µL e razão A260/A280

entre 1,8 e 2,0. Amostras que não atenderam aos critérios foram reprocessadas.

4.3.5 Extração de DNA das amostras de sangue em papel filtro

Para cada extração, foi utilizado um fragmento padronizado do papel-filtro contendo aproximadamente 6 mm de diâmetro da área impregnada com sangue. O DNA foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, São Paulo, Brasil), seguindo o protocolo recomendado para tecidos animais, com modificações.

Durante a etapa de lise em solução Nuclei Lysis, foi realizada trituração mecânica do fragmento, com adição de 2 µL de proteinase K (*Tritirachium album*; Ludwig Biotecnologia), livre de DNase, RNase e exonucleases detectáveis, com atividade >30 U/mg, mantendo incubação à temperatura ambiente. Após essa etapa, o protocolo foi conduzido conforme as instruções do fabricante. Em virtude do pequeno volume de amostra, todos os reagentes foram utilizados em metade do volume recomendado.

O DNA foi eluído em solução nuclease-free e armazenado a -20 °C até análise. A concentração e a pureza foram avaliadas por espectrofotometria, adotando-se como critérios de inclusão nas reações de PCR concentração mínima de 10 ng/µL e máxima 80ng/ µL e razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0. Amostras que não atenderam aos critérios estabelecidos foram submetidas a nova extração.

4.3.6 Controle de qualidade do DNA extraído

A qualidade do DNA recuperado foi avaliada por espectrofotometria (Thermo Fisher S120 NanoDrop™ Micro UV, Massachusetts, EUA), considerando-se a concentração (ng/µL) e a pureza determinada pela razão de absorbância A260/A280. Foram consideradas adequadas para as análises moleculares amostras com concentração entre 10 e 80 ng/µL e razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0. Amostras com concentração inferior a 10 ng/µL foram submetidas à reextração. Aquelas com concentração superior a 80 ng/µL foram diluídas em água nuclease-free (livre de DNase, RNase e exonucleases detectáveis) até atingirem a concentração desejada para padronização do input nas reações de PCR.

Adicionalmente, foi realizada PCR convencional para amplificação do gene constitutivo GAPDH como controle endógeno da qualidade e integridade do DNA extraído (Tabela 1). Amostras que não apresentaram amplificação do GAPDH na primeira tentativa foram submetidas à repetição da PCR e, quando necessário, à reextração do DNA. Após esses procedimentos, todas as amostras apresentaram amplificação satisfatória do controle endógeno, não havendo exclusão de amostras nas análises moleculares subsequentes.

4.3.7 Diagnóstico molecular

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 10 μL , contendo 5 μL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, São Paulo, Brasil), resultando em concentração final 1X, 0,4 μM de cada primer, 3,6 μL de água nuclease-free e 1 μL de DNA molde (padronizado entre 10 e 80 ng/ μL). Todas as reações foram conduzidas em termociclador automático Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (9902, Massachusetts, EUA).

Em cada corrida de PCR foram incluídos controle positivo, proveniente de animal previamente confirmado por sequenciamento nucleotídico, e controle negativo, constituído por água ultrapura nuclease-free (DNase- e RNase-free). A ausência de amplificação no controle negativo e a presença de banda no tamanho esperado no controle positivo foram critérios obrigatórios para validação da corrida.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, e a positividade foi definida pela presença de banda nítida no tamanho esperado para o alvo específico, conforme descrito para cada conjunto de iniciadores. Amostras que apresentaram banda fraca ou de intensidade limítrofe foram submetidas à repetição da PCR; a persistência do resultado, com tamanho de fragmento compatível e ausência de amplificação no controle negativo, foi considerada como positiva. Amplificações inespecíficas ou bandas em tamanhos divergentes do esperado foram consideradas negativas.

Para prevenção de contaminação, foram adotadas medidas de biossegurança molecular, incluindo separação física das áreas de preparo de reagentes (pré-PCR), manipulação de DNA molde e análise pós-amplificação; utilização de ponteiras com filtro; preparo do mix em cabine específica; e inclusão dos controles na seguinte ordem de pipetagem: controle positivo, amostras e, por último, controle negativo.

As seqüências dos iniciadores utilizados para triagem em nível de gênero e para identificação específica das hemobactérias e protozoários, após positividade na triagem, estão descritas abaixo.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos, alvo, tamanho do *amplicon* (pb) e referência utilizados em PCR para controle interno de extração de DNA de todas as amostras extraídas

Agentes		Iniciadores	Sequências (5'-3')	Gene	Fragmento (pb)	Referência
Piroplasmida/ <i>Hepatozoon</i> spp. (genérico)	1º reação	RIB-19	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGCCC	18Sr RNA	1700	Zahler <i>et al.</i> , 2000
		RIB-20	GAATTCCTTGTTACGACTTCTC			
	2º reação	BABrum F	ACCTCACCAGGTCCAGACAG	18Sr RNA	430	Silveira <i>et al.</i> , 2011
		BABrum R	GTACAAAGGGCAGGGACGTA			
<i>Ehrlichia</i> spp. (genérico)	1º reação	N516SCH 1 F	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	16Sr RNA	1195	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
		N516SCH 1 R	ACAACTTTTATGGATTAGCTAAAT			
	2º reação	N516SCH 2 F	GGGCACGTAGGTGGACTAG	16Sr RNA	443	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
		N516SCH 2 R	CCTGTTAGGAGGGATACGAC			
<i>Anaplasma</i> spp. (genérico)	1 reação	GE3a	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	16S rRNA	932	Massung <i>et al.</i> 1998
		GE10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC			
	2º reação	GE9f	AACGGATTATTCCTTATAGCTTGCT	16S rRNA	546	Massung <i>et al.</i> 1998
		GE2	GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG			
<i>Babesia vogeli</i>	cPCR	BCV-18S-F BCV-18S-R	GTGAACCTTATCACTTAAAGG CAACTCCTCCACGCAATCG	ITS1 ITS2	602	Duarte <i>et al.</i> , 2008
<i>Hepatozoon</i> spp. (genérico)	cPCR	HEP-1 HEP-4	CGCGAAATTACCCAATT TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT	18S rRNA	660-680	Criado Fornelio <i>et al.</i> , 2006
<i>Ehrlichia canis</i>	1º reação	ECC ECB	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	16S rRNA	478	Brandão <i>et al.</i> , 2019
	2º reação	HE ECA	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGG AA	16S rRNA	389	Brandão <i>et al.</i> , 2019
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	1º Reaçã o	MSP4AP5 MSP4AP3	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTAT G	msP4	849	de la Fuente <i>et al.</i> , 2005
	2º Reaçã o	msp4f msp4r	CTATTGGYGGNGCYAGAGT GTTTCATCGAAAATTCCGTGGTA		381	Bown <i>et al.</i> , 2007
<i>Anaplasma platys</i>	1º Reaçã o	ECC ECB	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	16S rRNA	473	Dawson <i>et al.</i> , 1996
	2º Reaçã o	APYS-F APYS-R	GTCGAACGGATTTTTGTCGT TAGATCACCGCCTTGGTAGG		212	Rufino <i>et al.</i> , 2013
<i>Leishmania</i> spp.	cPCR	LITSR L5.8S	CTGGATCATTTT CCGATG TGATACCACTTA TCGCACTT	ITS1	300-350	El Tai <i>et al.</i> 2000
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	cPCR	Mhc-F Mhc-R	GAAACTAAGGCCATAAATGACGC ACCTGTACCTCGATAACCTCTAC	16S rRNA	309	Altay <i>et al.</i> , 2020
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	cPCR	CMhp-F CMhp-R	ACGAAAGTCTGATGGAGCAATAC TATCTACGCATTCCACCGCTAC	16S rRNA	328	Altay <i>et al.</i> , 2020

<i>Mycoplasma</i> hemotrópico	HBTF	ATACGGCCCATATTCCTACG	16S rRNA	618	Criado- Fornelio <i>et al.</i> , 2003
	HBTR	TGCTCCACCACTTGTTCA			
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	GAPD H	400	Birkenheue <i>r et al.</i> , 2003
	GAPDH R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC			

cPCR: PCR convencional com uma reação;

Fonte: elaborado pelo autor (2026).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, corados com brometo de etídio. Foi aplicado em cada poço no gel, 5 µL do produto da amplificação. Utilizou-se 1 Kb Ladder Plus (Fermentas®) como padrão de peso molecular. Em seguida, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel sob potencial elétrico de 100 V por 30 minutos, utilizando a fonte de alimentação PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories), operando em modo de voltagem ou corrente constante com comutação automática, com faixa de saída ajustável entre 10e 300 V e 4–400 mA e potência máxima de 75 W. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta.

4.3.8 Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos das reações de cPCR e da segunda rodada das nPCRs foram purificados utilizando o QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Biotecnologia Brasil, São Paulo, Brasil), conforme as recomendações do fabricante. Os amplicons purificados foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger (Sanger et al., 1997), incluindo reação de sequenciamento, precipitação, ressuspensão e leitura em plataforma automatizada, realizado na Plataforma de Sequenciamento Sanger de BH – RPT01E, no Instituto René Rachou (Fiocruz Minas).

Nem todas as amostras positivas foram sequenciadas. Para cada agente investigado, foi selecionado um subconjunto representativo de amostras positivas, considerando qualidade da banda, intensidade do amplicon e representatividade por matriz biológica. A estratégia específica de seleção e o número de amostras sequenciadas para cada patógeno estão descritos detalhadamente nos Capítulos 1 e 2, de acordo com o agente investigado.

Os cromatogramas brutos obtidos foram inicialmente inspecionados quanto à qualidade dos picos, submetidos à edição manual e trimming das extremidades de baixa qualidade, e posteriormente montados em sequências consenso utilizando o software BioEdit v.7.0.5.3. As sequências consenso foram comparadas às disponíveis no GenBank por meio do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para confirmação da identidade com base no percentual de similaridade.

Os alinhamentos múltiplos foram realizados utilizando o algoritmo MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform), implementado no software MEGA 11 (Tamura et al., 2013). Sequências de referência previamente publicadas e disponíveis no GenBank foram incluídas nas análises, bem como sequências selecionadas como grupo externo (outgroup), conforme aplicável a cada agente.

As análises filogenéticas foram conduzidas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML), com seleção do modelo evolutivo mais adequado baseada no menor valor do Critério de Informação Bayesiano (BIC). O suporte dos nós foi estimado por meio de 1.000 réplicas de bootstrap, conforme descrito por Felsenstein (1985).

As sequências obtidas neste estudo foram submetidas ao GenBank, e os respectivos números de acesso (accession numbers) estão descritos nos capítulos específicos de cada agente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados no formato de artigos científicos, organizados em três capítulos distintos. O Capítulo 1 corresponde a um artigo publicado em 09/08/2025 na revista *Veterinary Microbiology* (PEREIRA, Mariana Rodrigues et al. First molecular evidence of vertical transmission of *Ehrlichia canis* in naturally infected female dogs in Brazil. *Veterinary Microbiology*, p. 110674, 2025).

O Capítulo 2 refere-se a um artigo submetido em dezembro de 2025 à revista *Acta Tropica*. O Capítulo 3 corresponde a um artigo submetido em dezembro de 2025 à revista *Veterinary Research Communications*.

5.1 CAPÍTULO 1

First Molecular Evidence of Vertical Transmission of *Ehrlichia canis* in Naturally Infected Female Dogs in Brazil

Mariana Rodrigues Pereira^a, Andressa de Oliveira Silva^a, Pedro Henrique Cotrin Rodrigues^a, Isabela de Oliveira Sales^b; Julia Angélica Gonçalves da Silveira^a, Camila de Valgas e Bastos^{a*}

^a Laboratório de Protozoologia Veterinária - PROTOVET, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

^b Veterinarian of AME Veterinary Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author: Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Tel: +55 31 3409-2082; e-mail: camilabastos@ufmg.br

Abstract

Ehrlichia canis is an obligate intracellular bacterium transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. This pathogen is also the etiological agent of canine monocytic ehrlichiosis, a disease with widespread global distribution and recognized zoonotic potential. Although vector-borne transmission is well established, evidence supporting the occurrence of vertical transmission remains limited. This study aimed to investigate the potential transplacental transmission of *E. canis* in 51 naturally infected pregnant bitches using molecular diagnostic techniques, genetic sequencing, and phylogenetic analysis. Blood and placental samples from the 51 dams, organ pool samples from 22 stillborn puppies, and peripheral blood from 40 live neonates up to five days of age were analyzed. Molecular analyses were performed using nested PCR targeting the 16S rRNA gene, with initial detection of the genus *Ehrlichia* and subsequent specific confirmation of *E. canis*, followed by genetic sequencing and phylogenetic characterization of the positive samples. *Ehrlichia* spp. DNA was detected in 27.45% of dams blood samples, 5.88% of placentas, 9.09% of stillborns organ pools, and 2.5% of live-born puppies up to five days old. The sequences obtained showed 100% identity with previously characterized *E. canis* isolates from different geographic regions. The study confirms the occurrence of transplacental transmission of *E. canis* in dogs and highlights the potential of this route in the maintenance and dissemination of zoonotic vector-borne agents. It emphasizes the need to study vertical transmission mechanisms of pathogens and their impact

in endemic areas, and to combine reproductive monitoring with infectious disease control in dogs for improved animal and public health.

Keywords: Ehrlichiosis, transplacental transmission, hemopathogens, tick-borne pathogens, pregnant female dog, PCR.

1. Introduction

Vector-borne diseases are highly prevalent in Brazil and represent a significant challenge for public health, especially considering that several of these infections have substantial zoonotic potential. Most relevant examples in Brazil are Brazilian spotted fever (BSF) and visceral *Leishmaniasis* (VL), which are responsible for clinical presentations ranging from nonspecific signs to severe manifestations, including persistent fever, marked anemia, splenomegaly, progressive weight loss, and, in the case of BSF, high lethality (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres, 2007).

In this context, hemopathogens represent a heterogeneous group of infectious agents, among which the rickettsia *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) stands out. This obligatory intracellular bacterium parasitizes mononuclear cells and is primarily transmitted through the bite of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: *Rhipicephalus linnaei* (Groves *et al.*, 1975). The first identification of *E. canis* infecting dogs in Brazil was reported in 1973 (Costa *et al.*, 1973), consolidating its recognition as the etiological agent of canine monocytic ehrlichiosis (CME).

Although traditionally regarded as a pathogen of veterinary relevance, human infections associated with nonspecific clinical manifestations have been documented in Venezuela and Costa Rica (Perez *et al.*, 2006; Bouza-Mora *et al.*, 2016). Other species of the *Ehrlichia* genus, such as *E. ewingii* and *E. chaffeensis*, have been well-documented to cause disease in humans in North America, Europe and Asia, where clinical manifestations included fever, headache, myalgia, and cough (Walker and Dumler, 1996; Buller *et al.*, 1999; Blanco and Oteo, 2002; Heitman *et al.*, 2016).

In animals, the most common hematological abnormalities associated with *E. canis* infection are thrombocytopenia and anemia (Dagnone *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2011). In addition to clinical evaluation, CME diagnosis can be confirmed through identification of the pathogen in stained blood smears, molecular detection, or serological testing (Harrus and Waner, 2011).

Vertical transmission of *E. canis* in Brazil, although suggested, has not yet been fully confirmed (Almeida *et al.*, 2010). Aspects related to its epidemiology and the underlying mechanisms of this transmission route require further investigation. The confirmation of vertical transmission of *E. canis* carries significant epidemiological implications: if infected females can transmit the agent transplacentally to their offspring, the rickettsia may persist in canine populations until the tick vector is reintroduced. This perpetuation mechanism undermines the efficacy of control strategies focused solely on vector-based measures, such as ectoparasiticide application.

Given the importance of *E. canis* to both veterinary and public health, the objective of this study was to investigate the occurrence of vertical transmission of this agent in naturally infected Brazilian dams.

2. Materials and methods

2.1 Ethics and permissions

This study was submitted to and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CEUA/UFMG) under protocol number 206/2024.

2.2 Study Area, Sample, and Data Collection

The inclusion criteria for this study were pregnant bitches admitted to a veterinary hospital located in Southeastern Brazil, who were undergoing elective cesarean section, were clinically stable, had no recent history of comorbidities, and where informed owner consent was obtained to test the dam and all of the puppies.

Samples were collected between March and December 2024 following cesarean delivery in a sterile hospital environment and included dams' peripheral blood, placentas, stillborn organ pools, and blood from live-born puppies. Whole blood and serum from dams were obtained via jugular venipuncture using sterile vacuum tubes containing EDTA and tubes without anticoagulant. Placental tissue was collected by removing approximately 10g of tissue and stored in sterile 15 mL falcon tubes. Tissue (15-20g) collected from the brain, liver, and spleen from stillborn puppies was pooled by puppy and stored in sterile 15 mL falcon tubes until processing. Whole blood samples from live-born puppies, up to five days of age, were collected using filter paper via ear tip puncture. All samples were stored at -20°C until genetic material extraction.

2.3 Molecular Diagnosis

The DNA from the samples was extracted from 300 μL of whole blood using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). For organ and filter paper samples, the ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega®, USA) was used, following the manufacturer's instructions for tissue processing. The quality and quantity of the extracted genetic material were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, Vermont, USA), considering DNA concentrations ranging from 50 to 80 ng/ μL and absorbance ratios at 260/280 nm for purity evaluation. Sample integrity was further confirmed through normalization PCR targeting the constitutive *gapdh* gene, with all samples yielding positive amplification.

The presence of PCR inhibitors was ruled out by amplifying a fragment of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene found in mammals, as described by Birkenheuer *et al.* (2003). Nested PCR (nPCR) reactions were performed to detect the *Ehrlichia* spp. genus, and all positive samples were subsequently tested specifically for *E. canis*. Additionally, all samples were evaluated for possible coinfection with the protozoan *Leishmania* spp., an endemic pathogen in the study region, by conventional PCR targeting the ITS1 gene (El Tai *et al.*, 2000). Detailed information regarding the pathogens investigated, target genes, primer sequences, amplicon sizes, and corresponding references is presented in Table 1.

Table 1. Primer sequences used to identify the genus/species of *Ehrlichia* spp., *Leishmania* spp. and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*)

Agents		Primer	Sequences (5'(-)3')	Target	Fragment (bp)	References
<i>Ehrlichia</i> sp.	1st reaction	N516SCH 1 F	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	16SrR NA	1195	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
		N516SCH 1 R	ACAACTTTTATGGATTAGCTAAAT			
	2nd reaction	N516SCH 2 F	GGGCACGTAGGTGGACTAG	16SrR NA	443	
		N516SCH 2 R	CCTGTTAGGAGGGATACGAC			
<i>Ehrlichia canis</i>	1st reaction	ECC	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	16S rRNA	478	Brandão <i>et al.</i> , 2019
		ECB	CGTATTACCGCGGCTGCTGGC			
	2nd reaction	HE	TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT	16S rRNA	389	
		ECA	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA			
<i>Leishmania</i> spp.		LITSR L5.8S	CTGGATCATTTC CCGATG TGATACCACTTA TCGCACTT	ITS1	300-350pb	El Tai <i>et al.</i> 2000
Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (<i>gapdh</i>)		GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	<i>gapdh</i>	400	Birkenheuer <i>et al.</i> , 2003
		GAPDH R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC			

In all PCR assays, the reaction mixture in the first cycle contained 7.5 μL of GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.6 μL of a solution containing the mixed

primers (10 mM), and 5.4 μ L of nuclease-free water. A volume of 1.5 μ L of total DNA was added to the reaction mixture to obtain a final volume of 15 μ L. The reaction mixtures in the second-round assays were similar, except that the templates were the PCR products from the first-round reactions (1.5 μ L) when nested. Ultra-pure Milli-Q DNase- and RNase-free water was used as a negative control. As positive control, DNA from a dog infected with *E. canis* (Moreira *et al.*, 2005) was used. The extracted DNA was amplified using an automatic thermocycler (Mastercycler®, Eppendorf, Darmstadt, Germany or T100 Thermal Cycler®, Bio-Rad, Hercules, USA). The PCR amplicons were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel (40 min; 100 V), which was then stained with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized under ultraviolet light.

2.4 Sequencing

PCR products from the second-round reactions were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Biotechnologia Brasil, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's recommendations. The purified amplicons were sequenced using the complete template reaction (Sanger reaction, precipitation, resuspension, and plate reading), performed on the Sanger Sequencing Platform of BH – RPT01E. Using the same oligonucleotides for sequence analysis, raw data in the form of chromatograms were aligned, edited, and analyzed using the BioEdit software, version 7.0.5.3 (Hall, 1999). The identity of each sequence was confirmed by comparison with sequences available in GenBank using the BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed on March 15, 2025 (Altschul *et al.*, 1990). After comparing identities, the analyzed sequences were classified based on their similarity with data already deposited in GenBank.

2.5 Phylogenetic Analysis

Phylogenetic trees were constructed using the software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), version 11. Multiple sequence alignments were performed with ClustalW, integrated into the platform, using sequences previously submitted to GenBank. The most suitable evolutionary models were selected based on the lowest scores of the Bayesian Information Criterion (BIC) and the corrected Akaike Information Criterion (AICc). Representative sequences were included as an outgroup in the analysis. The phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood (ML) method, based on the obtained alignments (Kimura, 1980; Nei and Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2021). The robustness of the tree topology was tested through 1000 bootstrap replicates, as implemented in the software (Felsenstein, 1985). For *Ehrlichia* spp., the Kimura 2-parameter model with a gamma distribution (K2 + G; 5 categories, parameter = 0.3607) was used as the evolutionary model (463 bp).

2.6 Cytology

Fresh blood samples stored in tubes containing EDTA as an anticoagulant were used for parasitological examination through blood smears, which were stained with a rapid Romanowsky stain (Rapid Panotic; Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and examined under a Nikon Eclipse Ei optical microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan), at 1000× magnification.

3. Results

3.1 Dogs

In this study, nPCR assays targeting the 16S rRNA gene were conducted for the detection of *Ehrlichia* spp. and *E. canis* in whole blood samples from 51 dams, 51 placentas, 22 stillborn organ pools, and 40 puppies up to 5 days old.

3.2 Molecular Assays

Molecular analysis of the 16S rRNA gene detected *Ehrlichia* spp. in 27.45% (14/51) of whole blood from dams, 5.88% (3/51) of placental, 9.09% (2/22) of stillborn organ pools, and 2.5% (1/40) of whole blood samples from live-born puppies. The two positive stillborns and one live-born puppy were from dams who were also PCR positive.

Species-specific PCR targeting *E. canis*, performed on samples previously positive for *Ehrlichia* spp. via 16S rRNA gene amplification, confirmed infection in 34.7% (5/14) of dams, 33.3% (1/3) of placentas, 100% (2/2) of stillborn organ pools, and 100% (1/1) of live-born puppy (Tables 2 and 3).

Table 2. Positive samples for *Ehrlichia* spp. and *Ehrlichia canis* detected by polymerase chain reaction (PCR) in blood from naturally infected dogs and in organ pool samples from stillborn puppies. The table includes the number of positive samples (N positives) and the total number of samples (N total) analyzed

Origin of samples	PCR	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>Ehrlichia canis</i>
Whole blood in EDTA from the female dogs	·N positives /N total	14/51	5/14
Stillborn puppies' organ pool	·N positives /N total	2/22	2/2
Placental samples	·N positives /N total	3/51	1/3
Whole blood in EDTA from puppies	·N positives /N total	1/40	1/1

Table 3. Materials were tested by nested PCR targeting the 16S rRNA gene for the genus *Ehrlichia* and *Ehrlichia canis*.

Samples	Whole blood from female dogs		Placentas		Pooled organs from stillborn puppies			Whole blood from live-born puppies		
	Genus <i>Ehrlichia</i>	<i>E. canis</i>	Genus <i>Ehrlichia</i>	<i>E. canis</i>	Number	Genus <i>Ehrlichia</i>	<i>E. canis</i>	Number	Genus <i>Ehrlichia</i>	<i>E. canis</i>
C1 -female	(+)	(-)	(-)	nt	1	(-)	nt	1	(+)	(+)
C2 - female	(+)	(-)	(-)	nt	1	(-)	nt	2	(-)	nt
C3 -female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C4 -female	(+)	(-)	(-)	nt	2	(-)	nt	3	(-)	nt
C5 -female	(+)	(-)	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C6 -female	(+)	(-)	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C7 -female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C8 -female	(-)		(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C9 - female	(+)	(+)	(+)	(+)	1	(+)	(+)	2	(-)	nt
C10-female	(+)	(-)	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C11-female	(-)	nt	(-)	nt	2	(-)	nt	**	**	**
C12-female	(+)	(-)	(-)	nt	2	(-)	nt	2	(-)	nt
C13-female	(-)	nt	(-)	nt	1	(-)	nt	2	(-)	nt
C14-female	(-)	nt	(-)	nt	2	(-)	nt	3	(-)	nt
C15-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C16-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C17-female	(-)	nt	(-)	nt	1	(-)	nt	**	**	**
C18-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C19-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C20-female	(+)	(+)	(+)	(-)	**	nt	nt	**	**	**
C21-female	(+)	(+)	(+)	(-)	**	nt	nt	**	**	**
C22-female	(+)	(-)	(-)	nt	**	nt	nt	1	(-)	nt
C23-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C24-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C25-female	(+)	(+)	(-)	nt	1	(+)	(+)	**	**	**
C26-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C27-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C28-female	(+)	(-)	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C29-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C30-female	(-)	nt	(-)	nt	2	(-)	nt	**	**	**
C31-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C32-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C33-female	(-)	nt	(-)	nt	2	(-)	nt	3	(-)	nt
C34-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C35-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C36-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	1	(-)	nt
C37-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C38-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C39-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C40-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C41-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C42-female	(+)	(+)	(-)	nt	2	(-)	nt	3	(-)	nt
C43-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	3	(-)	nt
C44-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C45-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C46-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	2	(-)	nt
C47-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C48-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**

C48-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**
C50-female	(-)	nt	(-)	nt	2	(-)	nt	**	**	**
C51-female	(-)	nt	(-)	nt	**	nt	nt	**	**	**

Three positive samples obtained from 16S rRNA gene-based analyses of *Ehrlichia* spp., including one dam blood and two stillborn organ pool samples, were sequenced, and the nucleotide sequences were deposited in GenBank (under the following accession numbers: PV351676, PV361677, and PV351675). The sequencing results showed 100% identity with *E. canis* strains previously reported in domestic dogs from Brazil, India, and Turkey (GenBank accession numbers: EF195134, PP860904, and KJ513197). The phylogenetic analysis is presented in Figure 1. All samples in this study tested negative for *Leishmania* spp. by PCR.

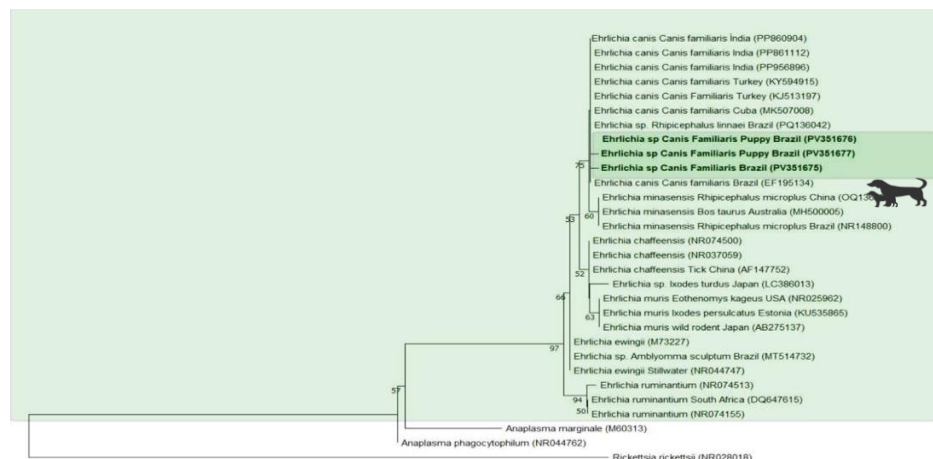


Figure 1. Phylogenetic tree based on a 463 bp alignment of the *Ehrlichia* spp. 16S rRNA gene involving 23 nucleotide sequences, using the maximum likelihood method and K2 + G as the evolutionary model. The numbers at the branching nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in bold, with access numbers provided in parentheses. *A. marginale* and *A. phagocytophilum* were used as external groups.

3.3 Cytology

The parasitological examination of the blood smears was also negative for all animals, which may be related to the low rickettsial load at the time of blood collection.

Discussion

This study provides new evidence of transplacental transmission of *E. canis* in naturally infected dams in Brazil, documenting the molecular detection of the agent in stillborn organ pool samples, in a live-born puppy, and in placentas from infected dams. Previous studies have investigated the possibility of vertical transmission of this rickettsia through the detection of *E. canis* DNA or morulae in monocytes of dams and their offspring. However, unlike the present study—which ensured that puppies were not exposed to ticks prior to testing—none of the previous studies ruled out the possibility of vector-borne transmission in the neonates (Tagues *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2010; Astigarraga, 2023). Transplacental transmission of *E. canis* is further supported by the detection of bacterial DNA in placental and fetal tissues, a finding previously reported only in sheep and goats in Italy (Chisu *et al.*, 2021) and documented here for the first time in dogs.

The detection of *Ehrlichia* spp. in 27.45% of the dams evaluated suggests that the physiological stress of pregnancy, combined with infection, may induce immunosuppression, impairing the host's immune response and increasing the risk of vertical transmission (Mshelia *et al.*, 2005). Supporting this hypothesis, *E. canis* DNA was detected in organs pooled from two stillborn puppies and in the blood of a live-born puppy, all born to molecularly positive dams. A possible explanation for fetal infection involves blood extravasation at the maternal–fetal interface, followed by phagocytosis of infected cells or infectious agents by trophoblasts in the marginal hematophagous zone—a mechanism analogous to erythrophagocytosis and iron endocytosis described in the endotheliochorial placenta of dogs (Oliveira *et al.*, 2012).

Despite these promising findings, our study has some important limitations. It is possible that the vertical transmission rate was underestimated. Additional puppies may have been infected, but pathogen load may have been below the detection threshold of the primers used in the nPCR. Other factors, such as the choice of genetic marker, assay sensitivity, and the type or quality of biological samples, may also have affected the ability to detect the pathogen. Furthermore, although the *E. canis*-specific nPCR is highly specific, it has lower sensitivity than the genus-targeting nPCR. For this reason, we applied the species-specific assay only to samples that tested positive in the genus-level nPCR.

The confirmation of transplacental vertical transmission of *E. canis* reinforces the role of dogs as potential reservoirs of the pathogen, capable of maintaining its circulation even in the absence of vector ticks. This transmission route contributes to the persistence and dissemination of the pathogen and should be considered within the framework of the One Health approach, given the zoonotic relevance of this pathogen.

Future investigations should explore the specific aspects of canine ehrlichiosis pathogenesis during pregnancy, as well as increase sample size, assess the presence of possible coinfections, employ multiple genetic markers, and incorporate serological approaches. These strategies will help improve our understanding of infection mechanisms in pregnant bitches and further clarify the role of vertical transmission in the epidemiology of *E. canis*.

Conclusion

Based on the results of this study, transplacental vertical transmission of *E. canis* from infected dams to their offspring is shown to be possible, although uncommon. These findings confirm this route of transmission and highlight a new challenge for the development of effective disease control strategies.

Conflict of interest

The authors declare that they have no financial, commercial, or any other conflicts of interest that could influence the results or interpretation of the data presented in this study.

Funding

This study was financed by scholarships from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), financial support for field and lab work, and a Research Productivity grant from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (315466/2021-9), the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-00708-21; APQ-02531-24), and the Federal University of Minas Gerais.

References

1. Almeida, A.B.P.F., Paula, D.A.J., Dutra, V., Nakazato, L., Mendonça, A.J. 2010. Infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platyse* em cadelas e neonatos de Cuiabá, Mato Grosso. Arch. Vet. Sci. 15, 127-134.
2. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
3. Astigarraga, María José Tintel. 2023. Vertical transmission of canine ehrlichiosis. J. Agricult. Scie. Res. 3, 12.

4. Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesiagibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 4172-4177.
5. Blanco, J.R., Oteo, J.A. 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 763-772.
6. Bouza-Mora, L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J.J., Salazar-Sánchez, L., Labruna, M.B., Aguiar, D.M. 2017. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.012>
7. Buller, R.S., Arens, M.Q., Hmiel, S.P., Paddock, C.D., Sumner, J.W., Rikihisa, Y., Unver, A., Gaudreault-Keener, M., Manian, F.A., Liddell, A.M., Schmulewitz, N., Storch, G.A. 1999. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 341, 148-155.
8. Chisu, V., Loi, F., Mura, L., Tanda, A., Chessa, G., Masala, G. 2021. Molecular detection of *Theileria sergentii/orientalis/buffeli* and *Ehrlichia canis* from aborted ovine and caprine products in Sardinia, Italy. *Vet. Med. Sci.* 7,1762-1768. 10.1002/vms3.510
9. Costa, J.O., Batista, J.A., Silva, M., Guimarães, M.P. 1973. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brazil. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* 25, 199-200.
10. Dagnone, A.S., Morais, H.S.A., Vidotto, M.C., Jojima, F.S., Vidotto, O. 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet. Parasitol.* 117, 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.001>
11. Dantas-Torres, F. 2007. Rocky mountain spotted fever. *Lancet Infect. Dis.* 7, 724-732.
12. Dantas-Torres, F. 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites Vectors.* 1, 1-17.
13. El Tai, N.O., Osman, O.F., el Imam, M.L., Presber, W., Schonian, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania*

- donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 575–579.
14. Felsenstein, J. 1985. Limites de confiança em filogenias: uma abordagem usando o bootstrap. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 39, 783–791
 15. Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L., Huxsoll, D.L. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36, 937-940.
 16. Hall, T.A. 1999. BioEdit: Um editor de alinhamento de sequência biológica fácil de usar e programa de análise para Windows 95/98/NT. 41, 95–98. https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT.
 17. Harrus, S., Waner, T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Vet. J.* 187, 292-296.
 18. Heitman, K.N., Dahlgren, F.S., Drexler, N.A., Massung, R.F., Behravesh, C.B. 2016. Increasing incidence of ehrlichiosis in the United States: a summary of national surveillance of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* infections in the United States, 2008–2012. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 52.
 19. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
 20. Morais, N.C., Castro, J.R., Mundim, A.V., Bastos, J.E.D., Ferreira, F.A., Souza, M.A., Salaberry, S.R.S., Lima-Ribeiro, A.M.C. 2011. Clinical and hematological aspects of dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. and *Leptospira interrogans*. *Biosci. J. (Online)*. 452-459.
 21. Moreira, S.M., Machado, R.Z, Passos, L.M.F. 2005. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Cien. Rural.* 35, 958-960.

22. Mshelia, G.D., Amin, J.D., Chaudhari, S.U.R. 2005. Haemogram of nigerian mongrel bitch at different stages of the reproductive cycle. *Pak Vet. J.* 25, 22–24.
23. Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
24. Oliveira, C.M., Rodrigues, M.N., Miglino, M.A. 2012. Iron transportation across the placenta. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 84, 1115-1120. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000055>
25. Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., Rikihisa, Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 110-117. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027.
26. Taques, I.I.G.G., Barbosa, T.R., Martini, A.C., Pitchenin, L.C., Braga, I.A., Melo, A.L.T., Nakazato, L., Dutra, V., Aguiar, D.M. 2016. Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 49, 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.09.002>.
27. Walker, D.H., Dumler, J.S. 1996. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 18.

5.2 CAPÍTULO 2

Vertical transmission of tick-borne and hemotropic pathogens in pregnant dogs: first report involving *Babesia vogeli* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*

Mariana Rodrigues Pereira^a, Andressa de Oliveira Silva^c, Pedro Henrique Cotrin Rodrigues^a, Isabela de Oliveira Sales^b; Ana Júlia Avelar de Rezende Oliveira^a; Maycos Luiz Anjos da Silva^a; Anisleidy Pérez Castillo^c Julia Angélica Gonçalves da Silveira^a, Camila de Valgas e Bastos^{a*}

^aDepartment of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

^bMédica Veterinária do AME Hospital Veterinário, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^cInstitute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

*Corresponding author: Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Tel: +55 31 3409-2082; e-mail: camilabastos@ufmg.br

Abstract

This study aimed to investigate the vertical transmission of *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, and hemotropic *Mycoplasma* via molecular detection in 51 blood samples from naturally infected female dogs, 51 placentas, 22 organ pools from stillborn puppies, and 44 blood samples from neonates up to five days of age. As a result, vertical transmission was confirmed for *A. platys* in seven (31.81%) stillborn organ pool samples, and for hemoplasmas in one (14.28%) organ pool and 12 (63.15%) neonate samples. Furthermore, this study provides the first record of this transmission route for the protozoan *B. vogeli* in three (13.63%) stillborns and two (25%) neonates and for the hemoplasma *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in one (14.28%) stillborn and 12 (63.15%) neonates. The data contribute to a better elucidation of the epidemiology of these agents in pregnant female dogs and emphasize the need for more in-depth investigations to clarify the detailed mechanisms surrounding the vertical transmission of hemopathogens, considering that this transmission route may play an important role in the maintenance and dissemination of these agents, especially in the absence of vectors.

Keywords: Transplacental transmission, hemoparasites, canine babesiosis, canine anaplasmosis, pregnant female dogs, PCR.

1. Introduction

The process of domestication of dogs (*Canis familiaris*) has exerted a profound influence on culture and the organization of human life in society, consolidating this species as a close companion throughout history (Larson *et al.*, 2012). Concurrently, characteristics such as high population density, free-roaming habits, and the capacity to transit between different environments make these animals important reservoirs and potential disseminators of zoonotic agents (Paschoal *et al.*, 2016).

In this context, Vector-Borne Pathogens (VBPs) assume an important role within the One Health concept, being responsible for some of the main diseases affecting dogs in Brazil. These agents encompass a wide etiological diversity, including hemoplasmas (do Nascimento *et al.*, 2012), apicomplexans of the genera *Babesia* and *Hepatozoon* (Dantas-Torres, 2008), in addition to rickettsiae of the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma*, which are recognized for their broad geographic distribution and zoonotic potential (André, 2018).

In Brazilian territory, the incidence and dispersion of these agents are directly related to the presence and population dynamics of their vectors, especially the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, the main transmitter of these hemopathogens. Introduced in Brazil during the colonial period, this ectoparasite has a strong association with dogs, its main hosts (Szabó *et al.*, 2005). Although bites on other animals, including humans, are considered accidental, *R. sanguineus* can reach high population densities in domestic and peridomestic environments (Labruna e Pereira, 2001; Guglielmone *et al.*, 2006), favoring infestations in kennels and residences. It is a species widely distributed throughout the country, more common in tropical and subtropical regions, and its expansion has been potentiated by climate and environmental changes, allowing the colonization of previously non-endemic areas (Irwin, 2002).

From a clinical-pathological perspective, canine hemopathogens exhibit distinct mechanisms of action, but converge in their potential to cause significant hematological and immunological imbalances. *Ehrlichia canis* infects monocytes, inducing severe anemia and thrombocytopenia; *Anaplasma platys* compromise platelets, leading to cyclic thrombocytopenia; *Babesia vogeli* causes direct erythrocyte destruction, resulting in hemolytic anemia; and hemoplasmas adhere to the erythrocyte membrane, promoting immune-mediated

hemolysis (Diniz e Aguiar, 2022; Tasker, 2020; Solano-Gallego et al., 2011; Gaunt et al., 2010). The coinfection of these agents potentiates hematological damage, potentially leading to severe clinical conditions, in addition to compromising the reproductive efficiency and well-being of the female dogs.

Although the vector transmission of these agents is widely documented in Brazil, the evidence regarding vertical transmission is still scarce. This knowledge gap is particularly relevant in contexts such as breeding kennels, where infected reproductive female dogs can act as silent sources of infection. This transmission route represents an added challenge for epidemiological control, since the infection can occur independently of the biological vector, even in environments with rigorous sanitary management and effective tick control. In this context, vertical transmission emerges as an alternative mechanism for the maintenance and dissemination of agents, compromising the effectiveness of traditional control strategies based exclusively on the elimination of arthropod vectors.

Given the relevance of *A. platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *B. vogeli*, *Hepatozoon canis*, and hemotropic *Mycoplasma* for public and veterinary health, this study aimed to investigate the occurrence of vertical transmission of these pathogens from naturally infected female dogs.

2. Materials and methods

All biological material collection procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), under protocol 206/2024.

2.1 Study Location, Collection Period, and Sample Origin

The samples used in this study were obtained from a veterinary hospital located in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (19°50'45"S, 43°58'21"W), between March and December 2024. A total of 51 pregnant female dogs, of different ages and breeds, underwent clinical and ultrasound monitoring throughout gestation. All these animals underwent elective cesarean sections performed at the institution's surgical center. It is emphasized that all female dogs were clinically stable, with no recent history of comorbidities or conditions that contraindicated the surgical procedure. It is also noted that the present study ruled out the presence of ectoparasites in the neonates evaluated, as all female dogs with access to the partner hospital's maternity ward were free of arthropods at the time of admission, an institutional requirement to ensure the safety of other animals.

Upon signing the informed consent form by the tutors, blood samples were collected from the 51 pregnant female dogs at the pre-partum period by jugular vein puncture, using sterile vacuum tubes containing EDTA. During the cesarean sections, the 51 placentas were

obtained, individually conditioned in identified plastic bags and stored at -20 °C. Subsequently, the samples were transported in a thermal box to the Protozoology Laboratory of the Federal University of Minas Gerais (Protovet-UFMG), where they remained under the same temperature conditions until laboratory processing.

In the postpartum period, 44 whole blood samples were collected from live neonates up to five days of age, by puncture of the ear tip with disposable lancets. The blood was deposited on specific filter paper (one or more cards per puppy), and the dry disks were conditioned in individually identified Eppendorf microtubes. In cases of stillborns, manipulation was performed in the Protovet laboratory under aseptic conditions. For each of the 22 stillborn puppies, an individual scalpel, a pair of sterile gloves, and a laminated surface were used to obtain an organ pool (brain, liver, and spleen). The tissues were conditioned in sterile 15 mL Falcon tubes and stored at -20 °C until the moment of genetic material extraction.

2.2 Blood Smear

Slides obtained from the female dogs' blood were stained with Panoptic Rapid® and read using a Nikon Eclipse Ei optical microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) at 100x magnification with the use of immersion oil. The slides were extensively evaluated, from the feathered edge to the body of the smear, avoiding areas of cell overlap, to increase the chance of visualizing hemopathogens.

2.3 Molecular Diagnosis

All molecular analyses were performed at the Protovet laboratory. DNA extraction from whole blood samples (EDTA), tissues (placentas and organ pools), and filter paper impregnated with neonate blood was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, São Paulo, Brazil), according to the manufacturer's recommendations, with specifications for each type of material. For the filter paper samples, modifications were included in the tissue protocol: addition of 2 µL of proteinase K (Biotec) during nuclear lysis and halving the volumes of the reagents, due to the low quantity of material. The quality of the extracted DNA was evaluated by spectrophotometry (NanoDrop Thermo Fisher S120 Micro UV, USA), considering the concentration (ng/µL) and the A260/280 absorbance ratio. As additional quality control, conventional PCR was performed for the constitutive gene GAPDH to verify DNA integrity and extraction efficiency.

Initially, screening was performed using cPCR (conventional PCR) and nPCR (*nested* PCR) for detection at the genus level in all samples, followed by the application of specific analyses only in those previously positive for the respective genus. This strategy was adopted

due to the greater sensitivity observed in the generic reactions compared to the specific ones. All samples were tested for *Leishmania* sp. considering the possibility of co-infections, as this is an endemic area for Canine Visceral Leishmaniasis. Detailed information on the agents investigated, target genes, primer sequences, amplicon sizes, and respective references are presented in Table 1.

Table 1. Nucleotide sequence, target, amplicon size (bp), and reference used in PCR for internal control of DNA extraction from all extracted samples.

Agentes		Primer's	Sequências (5'-3')	Gene	Fragmento (pb)	Referência
<i>Piroplasmida/ Hepatozoon</i> spp	1º reação	RIB-19	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGCCC	18Sr	1700	Zahler <i>et al.</i> , 2000
		RIB-20	GAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RNA		
	2º reação	BABrum F	ACCTCACCAGGTCCAGACAG	18Sr	430	Silveira <i>et al.</i> , 2011
		BABrum R	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	RNA		
<i>Ehrlichia</i> sp	1º reação	N516SCH 1 F	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	16Sr	1195	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
		N516SCH 1 R	ACAACCTTTTATGGATTAGCTAAAT	RNA		
	2º reação	N516SCH 2 F	GGGCACGTAGGTGGACTAG	16Sr	443	Kawahara <i>et al.</i> , 2009
		N516SCH 2 R	CCTGTTAGGAGGGATACGAC	RNA		
<i>Anaplasma</i> sp	1º reação	GE3a	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	16S rRNA	932	Massung <i>et al.</i> 1998
		GE10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	A		
	2º reação	GE9f	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT	16S rRNA	546	Massung <i>et al.</i> 1998
		GE2	GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	A		
<i>Babesia vogeli</i>	1º Reação	BCV-18S-F BCV-18S-R	GTGAACCTTATCACTTAAAGG CAACTCCTCCACGCAATCG	ITS1 ITS2	602	Duarte <i>et al.</i> , 2008
<i>Hepatozoon</i> sp	1º Reação	HEP-1 HEP-4	CGCGAAATTACCCAATT TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT	18S rRNA	660-680	Criado Fornelio <i>et al.</i> , 2006
<i>Ehrlichia canis</i>	1º reação	ECC ECB	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	16S rRNA	478	Brandão <i>et al.</i> , 2019
	2º reação	HE ECA	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA	16S rRNA	389	Brandão <i>et al.</i> , 2019

<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	1° Reação	MSP4AP5 MSP4AP3	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTAT G	msP4	849	De la Fuente <i>et al.</i> , 2005
	2° Reação	msp4f msp4r	CTATTGGYGGNGCYAGAGT GTTTCATCGAAAATTCCGTGGTA		381	Bown <i>et al.</i> , 2007
<i>Anaplasma platys</i>	1° Reação	ECC ECB	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	16S rRN A	473	Dawson <i>et al.</i> , 1996
	2° Reação	APYS-F APYS-R	GTCGAACGGATTTTTGTCGT TAGATCACCGCCTTGGTAGG		212	Rufino <i>et al.</i> , 2013
<i>Leishmania</i> sp	1° Reação	LITSR L5.8S	CTGGATCATTTT CCGATG TGATACCACTTA TCGCACTT	ITS1	300-350	El Tai <i>et al.</i> 2000
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	1° Reação	Mhc-F Mhc-R	GAAACTAAGGCCATAAATGACGC ACCTGTACCTCGATAACCTCTAC	16S rRN A	309	Altay <i>et al.</i> , 2020
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	1° Reação	CMhp-F CMhp-R	ACGAAAGTCTGATGGAGCAATAC TATCTACGCATTCCACCGCTAC	16S rRN A	328	Altay <i>et al.</i> , 2020
<i>Mycoplasma</i> hemotrópico		HBTF	ATACGGCCCATATTCCTACG	16S rRN A	618	Criado- Fornelio <i>et al.</i> , 2003
		HBTR	TGCTCCACCACTTGTCA			
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)		GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	GAP DH	400	Birkenheuer <i>et al.</i> , 2003
		GAPDH R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC			

The PCR reactions were performed by adding 9 μ L of a mix containing: 5 μ L of GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, SP, Brazil), 3.6 μ L of nuclease-free water, and 0.4 μ L of primer. To this mixture, 1 μ L of DNA from each sample was added. The extracted DNA was amplified using the automatic thermocycler (Applied Biosystems Veriti 96-well 9902, Massachusetts, USA). The positive control samples used were derived from experimentally or naturally infected animals, followed by confirmation via nucleotide sequencing, and the negative controls for the reactions consisted of DNase and RNase free ultrapure milli-Q water that accompanies the GoTaq Green Master Mix reagent kit.

The amplified products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide. 5 μ L of the amplification product was applied to each well in the gel. 1 Kb Ladder Plus (Fermentas®) was used as a molecular weight standard. Subsequently, the

products were run on the gel under an electric potential of 100 volts for 30 minutes and were later observed under ultraviolet light.

2.4 Genetic Sequencing

PCR products from the second-round reactions were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Biotechnologia Brasil, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's recommendations. The purified amplicons were sequenced using the complete template reaction (Sanger reaction, precipitation, resuspension, and plate reading), performed on the Sanger Sequencing Platform of BH – RPT01E. Using the same oligonucleotides for sequence analysis, raw data in the form of chromatograms were aligned, edited, and analyzed using the BioEdit software, version 7.0.5.3 (Hall, 1999). The identity of each sequence was confirmed by comparison with sequences available in GenBank using the BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed on March 15, 2025) (Altschul *et al.*, 1990). After comparing identities, the analyzed sequences were classified based on their similarity with data already deposited in GenBank.

2.5 Phylogenetic Analysis

Phylogenetic trees were constructed using the software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), version 11. Multiple sequence alignments were performed with ClustalW, integrated into the platform, using sequences previously submitted to GenBank. The most suitable evolutionary models were selected based on the lowest scores of the Bayesian Information Criterion (BIC) and the corrected Akaike Information Criterion (AICc). Representative sequences were included as an outgroup in the analysis. The phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood (ML) method, based on the obtained alignments (Kimura, 1980; Nei and Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2021). The robustness of the tree topology was tested through 1000 bootstrap replicates, as implemented in the software (Felsenstein, 1985).

3. RESULTS

3.1 Blood Smear

Microscopic reading of the stained blood smear slides from the 51 female dogs did not identify hemopathogens.

3.2 Molecular Diagnosis, Sequencing, and Phylogenetic Analysis

Molecular analyses were performed on whole blood and placenta samples from 51 female dogs, on organ pools from 22 stillborns, and on blood from 44 puppies up to five days of age. At least one of the hemopathogens was detected in all pregnant bitches. Vertical transmission, through the detection of at least one of the agents in organ pools or in the blood

of neonates, was confirmed in 100% of the litters investigated (Table 2). Conversely, no positive results were obtained for the protozoa *Hepatozoon* sp. and *Leishmania* sp., or for the bacterium *A. phagocytophilum*.

Table 2. Positivity percentage of each sample type for the different agents detected in the generic and specific reactions.

Hemopathogen species	Whole blood from female dogs	Placentas	Pooled organs from stillborn puppies	Whole blood from live-born puppies
<i>Anaplasma</i> sp	37/51 (72.54%)	24/51 (47.05%)	22/22 (100%)	1/44 (2.27%)
<i>Anaplasma platys</i>	5/37 (13.51%)	2/24 (8.33%)	7/22 (31.81%)	0/1 (0.0%)
<i>Ehrlichia</i> sp	14/51 (27.45%)	3/51 (5.88%)	2/22 (9.09%)	1/40 (2.27%)
<i>Ehrlichia canis</i>	5/14 (34.71%)	1/3 (33.33%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)
Piroplasmida	42/51 (82.35%)	32/51 (62.74%)	22/22 (100%)	8/44 (18.18%)
<i>Babesia vogeli</i>	12/42 (28.57%)	7/32 (21.87%)	3/22 (13.63%)	2/8 (25%)
Hemoplasmas	36/51 (70.58%)	18/51 (35.29%)	7/22 (31.81%)	19/44 (43.18%)
<i>Candidatus</i> Mycoplasma haematoparvum	26/36 (72.22%)	6/18 (33.33%)	1/7 (14.28%)	12/19 (63.15%)

<i>Mycoplasma</i>	4/36 (11.11%)	0/18 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/19 (0.0%)
<i>haemocanis</i>				

For *Anaplasma* spp., the observed positivity rates were 72.54% in the female dogs' blood samples, 47.05% in the placentas, 77.27% in the organ pools from the stillborns, and 2.27% in the neonate blood. The specific nPCR for *A. platys* revealed infection in 13.51% of the maternal blood samples, 8.33% of the placentas, 31.81% of the organ pools, and absence of detection in the neonate blood samples.

Although a large part of the samples was characterized at the species level through specific primers, two whole blood samples, initially negative for the species-specific primer, were submitted to sequencing with the generic primer to confirm molecular identity. Considering the wide occurrence of *A. platys* in dogs, this representative pair of samples—mother and puppy—was selected to prove vertical transmission and enable the extrapolation of findings through phylogenetic analysis. The sequences obtained (GenBank accession numbers: PX062354 and PX062355) confirmed the molecular identification and showed high similarity (> 90%) with *A. platys* isolates previously described in different regions of the world, including cattle from Cuba, goats from the Philippines, and dogs from Brazil (Figure 1).

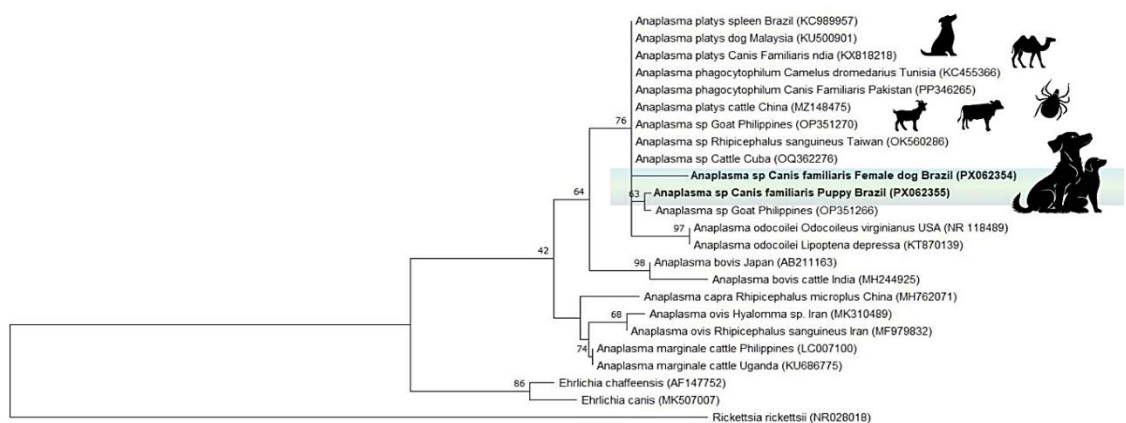


Figure 1. Phylogenetic tree based on a 546 bp alignment of the *Anaplasma* spp. 16S rRNA gene involving 24 nucleotide sequences, using the maximum likelihood method and K2 + G as the evolutionary model. The numbers at the branching nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents evolutionary distance. The sequences detected in the present study

are highlighted in bold, with access numbers provided in parentheses. *Rickettsia rickettsii* was used as external group.

The molecular tests amplified DNA belonging to the Piroplasmida order or the *Hepatozoon* genus in 82.35% of the female dogs' blood samples, 62.74% of the placentas, 68.18% of the organ pools, and 18.18% of the neonate blood samples. Three amplicons resulting from pPCRs directed at the species, derived from the mother's whole blood, placenta, and the blood of a neonate, were submitted to genetic sequencing. In these, it was possible to confirm the exclusive presence of *B. vogeli* (GenBank accession numbers: PV549412, PV549413, and PV549414, respectively). The detection of this same species was observed in 28.57% of the maternal blood samples, 21.87% of the placentas, 13.63% of the organ pools, and 25% of the neonates. The BLASTn analysis revealed an identity ranging from 98% to 99.75% and clustered the sequences detected in this study with *B. vogeli* isolates previously described in dogs from Brazil, Taiwan, India, and Colombia (Figure 2).

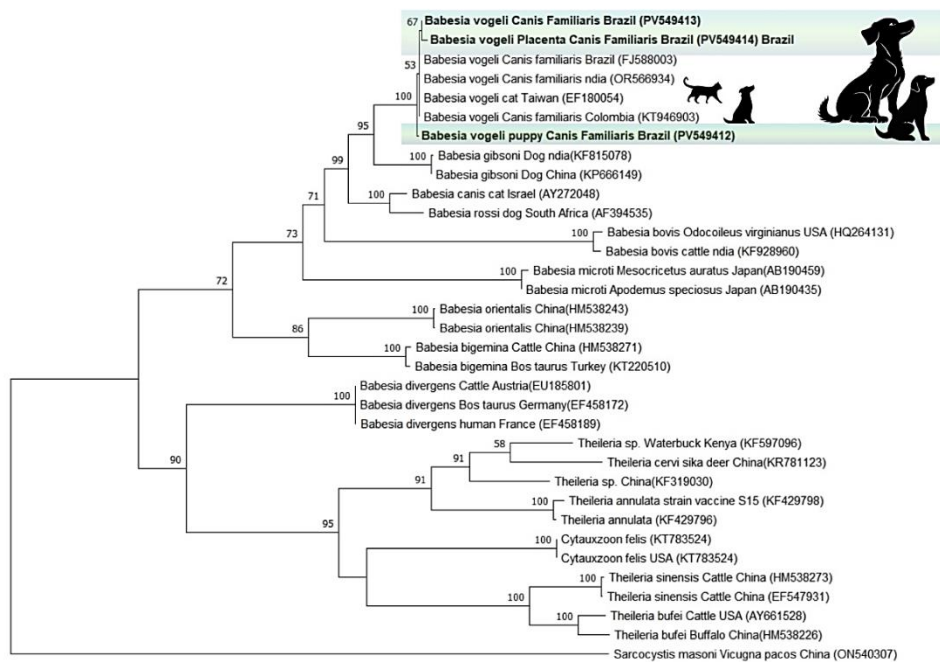


Figure 2. Phylogenetic tree based on a 602 bp alignment of the *Babesia vogeli*. ITS 1 and ITS 2 gene involving 34 nucleotide sequences, using the maximum likelihood method and K2 as the evolutionary model. The numbers at the branching nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in bold, with access numbers provided in parentheses. *Sarcocystis masoni* were used as external groups.

Additionally, regarding hemoplasmas, generic cPCRs revealed positivity in 70.58% of the maternal blood samples, 35.29% of the placentas, 31.8% of the organ pools, and 43.18% of

neonate blood samples. The specific cPCRs for the pregnant female dogs' blood samples identified *Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum* (*Ca. M. haematoparvum*) in 72.22% of the cases and *M. haemocanis* in 11.11%. In the placentas, 33.33% were positive for *Ca. M. haematoparvum*, while no sample showed positivity for *M. haemocanis*. In the organ pools of the stillborns and the neonates' blood, the presence of *Ca. M. haematoparvum* was exclusively detected, with rates of 14.28% and 63.15%, respectively. The sequencing analyses, performed on whole blood samples from one female dog, its placenta, and the blood of its stillborn puppy, revealed an identity ranging from 92% to 95.75% with *Mycoplasma* sp. in the BLASTn analysis (GenBank accession numbers: PX071996, PX071997, and PX071997), and clustered the detected sequences with others described in hedgehogs in Brazil (Figure 3).

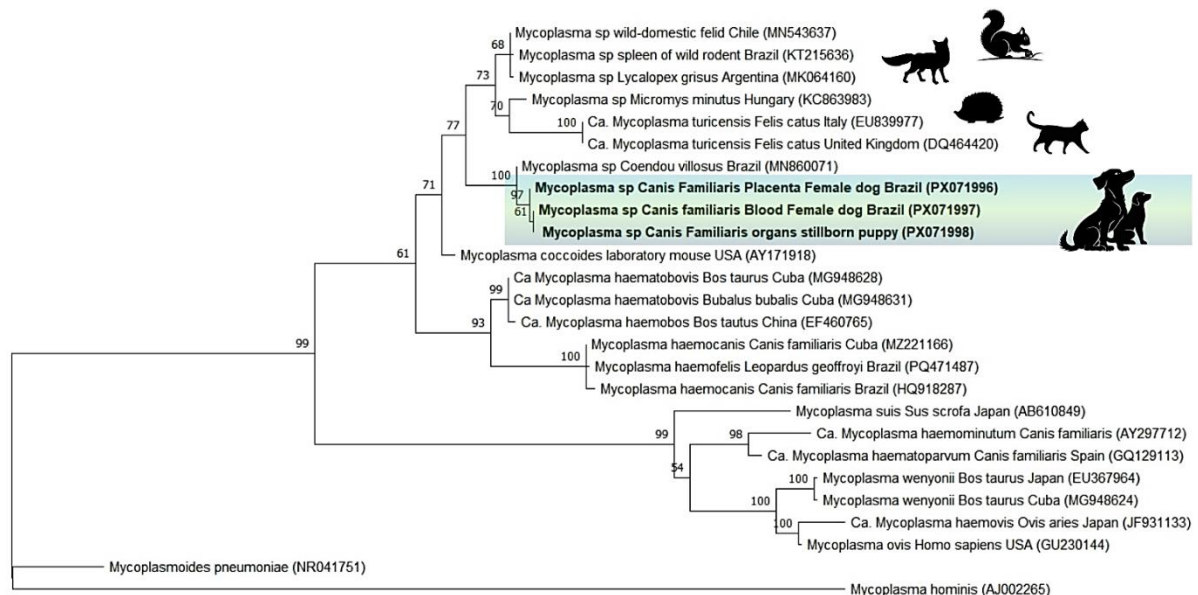


Figure 3. Phylogenetic tree based on an alignment of 600 bp of *Mycoplasma* spp. 16S rRNA gene involving 25 nucleotide sequences, using the ML method and TN + G as an evolutionary model. The numbers at the branch nodes of the tree indicate bootstrap values from 1000 replications. The scale bar represents the evolutionary distance. The sequences detected in the present study are highlighted in bold, with accession numbers provided in parentheses. *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis* were used as outgroups.

It is relevant to mention that, within the same litter, we observed puppies that were positive and negative for the same agent, and that all detailed tables with information on infections per material type for each female dog are in the supplementary material of this article (Tables 4, 5 and 6). Furthermore, coinfections were identified in all types of samples analyzed, involving all genera and orders of hemopathogens investigated. Table 3 presents the

percentages of coinfections by material type, highlighting the different combinations among the detected agents.

Table 3. Frequency of coinfections detected in the different sample types (whole blood, placenta, stillborn organs, and neonate blood), with the correlation between the identified agents.

Coinfection	Whole blood from female dogs	Placentas	Pooled organs from stillborn puppies	Whole blood from live-born puppies
Ap + Myc	(8/51)	(0/42)	(1/13)	(0/15)
Pir + Ehr	15.68%	0%	7.69%	0%
Ap+Myc+Pir	(16/51) 31.37%	(7/42) 16.16%	(6/13) 46.15	(0/15) 0%
Ap+Myc+Ehr	(0/51) 0%	(0/42) 0%	(0/13) 0%	(0/15) 0%
Ap+Pir+Ehr	(1/51) 1.9%	(2/42) 4.7%	(1/13) 7.69%	(0/15) 0%
Pir+Myc+Ehr	(3/51) 5.88%	(1/42) 2.3%	(0/13) 0%	(1/15) 6.66%
AP + Myc	(3/51) 5.88%	(1/42) 2.3%	(0/13) 0%	(0/15) 0%
AP +Pir	(8/51) 15.68%	(11/42) 26.19%	(5/13) 38.46%	(1/15) 6.66%
Ap + Ehr	(0/51) 0%	(0/42) 0%	(0/13) 0%	(0/15) 0%
Myc + Ehr	(0/51) 0%	(0/42) 0%)	(0/13) 0%	(0/15) 0%
Pir + Ehr	(1/51) 1.9%	(0/42) 0%	(0/13) 0%	(0/15) 0%
Myc + Pir	(2/51) 3.9%	(3/42) 7.14%	(0/13) 0%	(3/15) 20%
AP	(1/51) 1.9%	(3/42) 7.14%	(0/13) 0%	(0/15) 0%
MYC	(4/51) 7.8%	(6/42) 14.28%	(0/13) 0%	(9/15) 60%
PIR	(3/51) 5.88%	(8/42) 19.09%	(0/13) 0%	(1/15) 6.66%
EHR	(0/51) 0%	(0/42) 0%	(0/13) 0%	(0/15) 0%

AP: *Anaplasma* sp; MYC: *Mycoplasma* sp; EHR: *Ehrlichia* sp; PIR: piroplasmida

4. Discussion

The findings of this study demonstrate a high occurrence of vector-borne hemopathogens in naturally infected female dogs in the municipality of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. It is emphasized that the city is considered an endemic area for a large part of the investigated agents, which contextualizes the high detection rate observed. However, this pattern contrasts with the absence of positivity for *Leishmania* spp., whose infection is frequently identified in dogs in the region. Such a discrepancy may be related to the type of sample used, as whole blood may present lower diagnostic sensitivity for this protozoan, especially with the primers employed, or low parasitemia at the time of collection. A positivity exceeding 95% was reported in the direct detection of *Leishmania* sp. in samples of bone marrow, spleen, mesenteric lymph nodes, and ear skin from dogs in another municipality in Minas Gerais. Notably, 36.6% of the animals analyzed were asymptomatic, despite the presence of parasites in tissues such as the skin Lopes *et al.* (2020) . Our findings would possibly be distinct if skin fragments from the animals were included in the molecular analyses.

For the family *Anaplasmataceae*, the main infecting agents reported in Belo Horizonte are *E. canis*, with a prevalence between 36% and 50%, and *A. platys*, ranging between 4.1% and 17.2% (Costa-Júnior *et al.*, 2013). This last hemobacterium exhibits tropism for platelets, being the etiological agent of infectious cyclic thrombocytopenia (Breitschwerdt *et al.*, 2014), and although many animals remain without evident clinical signs for this disease, manifestations such as lethargy, decreased or lost appetite, weight loss, fever, petechiae, and episodes of epistaxis have already been described (Diniz e Aguiar, 2022).

In our study, 72.54% of the pregnant female dogs were positive for the genus *Anaplasma* by generic nPCR in whole blood, with this reaction being capable of amplifying different species of the genus. However, only 13.51% of these samples amplified in the specific nPCR for *A. platys*, possibly due to the lower sensitivity of these reactions. The positivity in placental tissues of the same female dogs was 47.05%, reinforcing the possibility of transplacental transmission.

The vector route, mediated by the tick *R. sanguineus* sensu lato, is considered the main form of *A. platys* transmission; however, the vertical transmission of this agent has already been described by Latrofa *et al.* (2016), who detected *A. platys* DNA in fetal spleen and liver samples from five stillborn dogs in Italy. Corroborating this result, in our study, *Anaplasma* sp. infection was identified in 77.27% of the organ pool samples (the same organs) from stillborns, with specific positivity for *A. platys* in 31.81% of them. We found only 2.27% positivity for *Anaplasma* sp. by generic nPCR in whole blood samples from neonates, and this result is

possibly associated with the choice of biological material type used in the analysis. The low quantity of blood impregnated on filter paper may have contributed to the underestimation of this index.

Belonging to the same genus, *A. phagocytophilum* is an intracellular rickettsia with tropism for granulocytic cells, being the etiological agent of Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA). This pathogen has a worldwide distribution, and its seropositivity frequency in dogs reached 42.8% in the city of Belo Horizonte Silveira et al. (2017), where there is also a report of coinfection by *A. phagocytophilum* and *E. canis* in a female dog (Silveira et al., 2015), highlighting the relevance of canine exposure to this agent. However, in our study, none of the female dogs evaluated were positive for *A. phagocytophilum*. Furthermore, to our knowledge, there are no records in the literature of vertical transmission in dogs associated with this agent, which is consistent with our findings, which also did not evidence its presence in any of the analyzed materials. Nevertheless, transplacental transmission of *A. phagocytophilum* has already been experimentally demonstrated in sheep in Norway, with the detection, by PCR, of the agent in brain and spleen samples from neonates, listing this as a possible route of transmission (Reppert et al., 2013).

Transplacental transmission of *Babesia* in dogs has already been documented in countries such as Japan, where *B. gibsoni* was associated with fatal infection in four puppies (Fukumoto et al., 2005). However, no description of this transmission route has been reported for *B. vogeli*, thus positioning the present study as the first to describe the vertical transmission of this protozoan, to our knowledge. The nPCR for piroplasmids, which covers all *Babesia* species, detected infection in 77.27% of the organ pools and in 18.18% of the neonate whole blood samples. In turn, the specific cPCR to *B. vogeli*, which is less sensitive, showed detection rates of 13.63% and 25%, respectively, for the same sample types, confirming the occurrence of a new transmission route for this agent.

In pregnant female dogs, the detection of *B. vogeli* in whole blood and placental samples was 28.57% and 21.87%, respectively. It is noted that these values may have been minimized due to the sensitivity limitations associated with the specific primers employed. Although cases associated with *B. gibsoni* have been reported in the South of the country (Braccini et al., 1992; Trapp et al., 2006), *B. vogeli* is the main agent of canine babesiosis in Brazil, infecting up to 42% of dogs with hemopathogens in Belo Horizonte (Bastos et al., 2004). These data are consistent with the positivity percentage observed in the present study and reinforce the importance of monitoring this hemopathogen, especially considering that, in puppies or

immunosuppressed animals, its pathogenicity tends to be more severe, characterized by the invasion and destruction of erythrocytes, culminating in hemolytic anemia (Castro et al., 2020).

Our study revealed an occurrence of 70.58% of hemotropic *Mycoplasma* spp. among the tested pregnant female dogs. These hemobacteria have been described as parasitizing dogs in various parts of the world, including Brazil (Silva-Santos et al., 2014; Alves et al., 2014), and the main species affecting these animals are *Mycoplasma haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* (Tasker, 2020). A positivity frequency of 2.06% (9/437) for *M. haemocanis* in dogs was reported in Rio de Janeiro, Brazil. Barbosa et al., 2021, and emphasize that the prevalence of this species is higher in the country when compared to *Ca. M. haematoparvum*. These findings contrast with the results of our study, which identified 72.2% positivity for *Ca. M. haematoparvum* and 11.11% for *M. haemocanis*. It is important to highlight that the study by Barbosa et al did not include testing for *Ca. M. haematoparvum*, which limits direct comparison with our data, which contemplated both agents. However, the same study (Barbosa et al. 2021), documents that the presence of wild animals and rodents was statistically associated with the *Mycoplasma* spp. PCR positivity status in dogs. This correlation corroborates our study, where the phylogenetic analysis clustered the detected sequences with others described in hedgehogs and rodents in Brazil, indicating that different animal species possibly share this strain of the agent and the possible vectors responsible for its transmission. It is worth noting that *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) is pointed out as a vector of *M. haemocanis* (Wengi et al., 2008), with its experimental transmission confirmed in the country by Seneviratna et al. (1973). The tropical lineage of this tick, recently recognized as *R. linnaei*, is highly prevalent in Brazil and is a proven biological vector for *B. vogeli* in dogs.

Vertical transmission of *M. haemocanis* was suggested by Lashnits et al. (2019), who reported a neonate positive by PCR for *M. haemocanis* from the first to the fifth month of life. However, the authors could not exclude the possibility of vector transmission of the agent. In our study, no puppy was positive for *M. haemocanis*. However, one organ pool (1/7) tested positive for *Ca. M. haematoparvum*, as did 12 (12/44) whole blood samples from newborns up to five days of age. Similarly, Andrade et al., (2024) found 42.75% positivity for *Mycoplasma* sp. using whole blood samples and no positivity in brain and spleen pools from 236 calves in Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, reaffirming whole blood as an eligible material for this diagnosis. To our knowledge, these findings position the present study as the first to demonstrate the vertical transmission of *Ca. M. haematoparvum* in dogs.

All puppies included in the study had samples collected up to five days of age, which makes vector transmission unfeasible, considering the incubation period of most of the

pathogens investigated. The presence of the agents in placental tissues and stillborn puppies reinforces the probability of transplacental transmission. However, it is also necessary to investigate the possibility of vertical transmission of the agents through the nursing of neonate puppies, a route under investigation for *L. infantum*. DNA of this agent has already been detected in the milk of naturally infected lactating female dogs, and amastigote forms were observed in the lumen of the mammary gland, suggesting that the parasite may be present in this biological fluid and transmitted to the puppies (Boechat et al., 2016; Ribeiro et al., 2022).

Fetal infection via the transplacental route can occur through blood extravasation at the maternal-fetal interface, followed by phagocytosis of infected cells or infectious agents by trophoblasts in the hematophagous marginal zone—a mechanism analogous to the erythrophagocytosis and iron endocytosis described in the endotheliochorial placenta of dogs (Oliveira et al., 2012).

In the positive litters of this research, variation in the occurrence of infection was observed. In some litters, such as those infected with *Anaplasma* sp., all stillborns were affected; while in others, only one puppy in the litter showed infection for *Mycoplasma* sp. This finding, detailed in the supplementary material, confirms the absence of a uniform pattern of infection, while raising the hypothesis that infections may be associated with the low Apgar score of some newborns or the mortality of only some puppies within the same litter. However, additional studies with comparative clinical evaluations between hemopathogen-infected and uninfected puppies are needed to confirm or refute this hypothesis.

Coinfections were found in all materials and for all agents. In the female dogs' blood, the most frequent coinfection included *Anaplasma*, *Babesia*, and *Mycoplasma* sp. (31.37%), as well as in the organ pools (46.15%). In the placentas, *Anaplasma* and *Babesia* (26.19%) were prominent, and in the puppies' blood, *Mycoplasma* and *Babesia* spp. The findings highlight *Babesia* sp. infection as one of the most frequently found, a fact that agrees with studies addressing this agent in Minas Gerais (Bastos et al., 2004; Costa-Júnior et al., 2009). Furthermore, the sharing of vectors among hemopathogens directly contributes to the occurrence of these multiple infections, which can hinder diagnosis due to cross-reactions and complicate the treatment of infected animals. It is worth noting that the findings regarding infection by *E. canis* isolated were detailed in a previous study (Pereira et al., 2025).

Some limitations of this study include the absence of detailed information on the history of the pregnant female dogs involved, as well as the lack of longitudinal monitoring of the litters to evaluate the clinical development of vertically infected puppies. Furthermore, it is possible that a larger number of puppies were infected, but presenting parasite loads below the detection

limit of the *primers* used in the PCRs. Other factors, such as the choice of genetic marker, the sensitivity of the assays, and the quality or type of biological samples, may also have influenced the pathogen's detection capacity. Future studies should investigate variations in parasitemia during the gestation of female dogs, analyze the clinical history and environment where the animals involved in the study are kept, and monitor the litters to evaluate the development of infected puppies. It is also important to use multiple genetic markers and incorporate serological methods. These approaches will contribute to deepening the knowledge of infectious processes in pregnant female dogs and clarifying with greater precision the role of vertical transmission in the epidemiology of hemoparasitoses.

5. Conclusion

Based on the results of this study, the vertical transplacental transmission of *A. platys*, *B. vogeli*, and *Ca. M. haematoparvum* from infected female dogs to their puppies proves possible, being described for the first time for the latter two agents. These findings confirm this transmission route, without the participation of the biological vector, and highlight a new challenge for the development of effective strategies to control vector-borne diseases.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no financial, commercial, or any other conflicts of interest that could influence the results or the interpretation of the data presented in this study.

Funding

This study was financed by scholarships from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), with financial support for fieldwork and laboratory activities, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (315466/2021-9; CNPq/SECTICS/CAPES/FAPs no 46/2024 and 308527/2025–9), the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) (APQ-00708-21; APQ-02531–24), the Postgraduate Program in Animal Science at UFMG, and the Federal University of Minas Gerais.

Appendix A. Supplementary data

Tables 4, 5, and 6 provide supplementary data.

References

1. Altay, K., Sahin, O. F., Erol, U., & Aytmirzakizi, A. (2023). First molecular detection and phylogenetic analysis of *Mycoplasma wenyonii* and *CandidatusMycoplasma haemobos* in cattle in different parts of Kyrgyzstan. *Biologia*, 78(2), 633-640. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01292-4>

2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
3. Alves, T. B., Faggion, S. A., Santos, E. V., Roberto, P. G., França, S. C., Fachin, A. L., & Marins, M. (2014). Real-time PCR-based study of haemotrophic *Mycoplasmas* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(2), 333-336.
4. André, M. R. (2018). Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia*/Neo*Ehrlichia* agents in terrestrial wild carnivores worldwide: implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. *Frontiers in veterinary science*, 5, 293. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00293>
5. Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesiagibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4172-4177. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>
6. Boechat, V. C., Mendes Junior, A. A. V., Madeira, M. D. F., Ferreira, L. C., Figueiredo, F. B., Rodrigues, F. D. C. D. C., ... & Menezes, R. C. (2016). Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 115(6), 2371-2379. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4987-4>
7. Bown, K. J., Lambin, X., Ogden, N. H., Petrovec, M., Shaw, S. E., Woldehiwet, Z., & Birtles, R. J. (2007). High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1771-1776. <https://doi.org/10.1128/jcm.00365-07>
8. Braccini, G. L., Chaplin, E. L., Stobbe, N. S., Araújo, F. A. P., & Santos, N. R. (1992). Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande Do Sul, Brazil, 1986-1990.
9. Brandão, V. M. D., Barrozo, P. H. M., Sousa, L. O., Santos, R. C. D., Schwanke, K., Sampaio, F. D., ... & Cavalcante, G. G. (2019). Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. *Ciência Rural*, 49(12), e20190414. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190414>
10. Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Qurollo, B. A., Saito, T. B., Maggi, R. G., Blanton, L. S., & Bouyer, D. H. (2014). Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasites & vectors*, 7(1), 298. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>
11. Castro, V. V., Ayres, E. D. C. B. S., Canei, D. H., Pereira, M. E., Sousa, V. R. F., Chitarra, C. S., ... & Almeida, A. D. B. P. F. D. (2020). Molecular prevalence and factors associated with *Babesia vogeli* infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil. *Ciência Rural*, 50, e20190389.

12. Costa-Júnior, L. M., Rembeck, K., Passos, L. M. F., & Ribeiro, M. F. B. (2013). Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 109(3-4), 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011>
13. Costa-Júnior, L. M., Ribeiro, M. F. B., Rembeck, K., Rabelo, E. M. L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., ... & Passos, L. M. F. (2009). Canine babesiosis caused by *Babesiacanis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 257-260. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.07.002>
14. Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary microbiology*, 93(4), 307-317. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0)
15. Criado-Fornelio, A., Ruas, J. L., Casado, N., Farias, N. A. R., Soares, M. P., Müller, G., ... & Barba-Carretero, J. C. (2006). New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology*, 92(1), 93-99. <https://doi.org/10.1645/GE-464R.1>
16. da Silva, S. M., Ribeiro, V. M., Ribeiro, R. R., Tafuri, W. L., Melo, M. N., & Michalick, M. S. M. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 166(1-2), 159-162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011>
17. Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1, 1-17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>
18. Dawson, J. E., Warner, C. K., Baker, V., Ewing, S. A., Stallknecht, D. E., Davidson, W. R., ... & Olson, J. G. (1996). *Ehrlichia*-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *The Journal of parasitology*, 52-58. <https://doi.org/10.2307/3284115>
19. de Faria Valle, S., Messick, J. B., Dos Santos, A. P., Kreutz, L. C., Duda, N. C. B., Machado, G., ... & González, F. H. D. (2014). Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(4), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.08.001>
20. de la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., & Gortázar, C. (2008). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Research in veterinary science*, 84(3), 382-386. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.018>
21. de Valgas E Bastos, C., Moreira, S. M., & Passos, L. M. F. (2004). Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 158-160. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.023>

22. Diniz, P. P. V., & de Aguiar, D. M. (2022). Ehrlichiosis and anaplasmosis: An update. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 52(6), 1225-1266. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.002>
23. do Nascimento, N. C., Santos, A. P., Guimaraes, A. M., SanMiguel, P. J., & Messick, J. B. (2012). *Mycoplasma haemocanis*—the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary research*, 43, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-66>
24. Duarte, S. C., Linhares, G. F. C., Romanowsky, T. N., da Silveira Neto, O. J., & Borges, L. M. F. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesiacanis canis*, *Babesiacanis vogeli* and *Babesiacanis rossi* by PCR assay. *Veterinary parasitology*, 152(1-2), 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.013>
25. El Tai, N. O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M. A., Oskam, L., El Safi, S. H., ... & Schönian, G. (2001). *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Experimental parasitology*, 97(1), 35-44. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>
26. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
27. Ferroglio, E., Battisti, E., Zanet, S., Bolla, C., Concialdi, E., Trisciuglio, A., ... & Biglino, A. (2018). Epidemiological evaluation of *Leishmania infantum* zoonotic transmission risk in the recently established endemic area of Northwestern Italy. *Zoonoses and public health*, 65(6), 675-682. <https://doi.org/10.1111/zph.12477>
28. Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental *Babesiagibsoni* infections in dogs. *International journal for parasitology*, 35(9), 1031-1035. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.018>
29. Hall, T.A. BioEdit: Um editor de alinhamento de sequência biológica fácil de usar e programa de análise para Windows 95/98/NT. 1999, 41, 95–98. Disponível online: https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_
30. Kawahara, M., Tajima, T., Torii, H., Yabutani, M., Ishii, J., Harasawa, M., ... & Rikihisa, Y. (2009). *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 1991. <https://doi.org/10.3201/eid1512.081667>
31. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
32. Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y., Peters, J., ... & Lindblad-Toh, K. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8878-8883. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203005109>
33. Lashnits, E., Grant, S., Thomas, B., Qurollo, B., & Breitschwerdt, E. B. (2019). Evidence for vertical transmission of *Mycoplasma haemocanis*. <https://doi.org/10.1111/jvim.15517>

34. Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., de Caprariis, D., Cantacessi, C., Capelli, G., Lia, R. P., ... & Otranto, D. (2016). Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasites & vectors*, 9(1), 269. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1545-y>
35. Lopes, J. V., Michalsky, É. M., Pereira, N. C. L., Paula, A. J. V. D., Souza, A. G. M., Pinheiro, L. C., ... & Dias, E. S. (2020). Canine visceral *Leishmaniasis* in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200141. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0141-2020>
36. Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B., & Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic *Ehrlichiae*. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 1090-1095. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1090-1095.1998>
37. Nei, M. (1987). *Genética evolutiva molecular*. Imprensa da Universidade de Columbia.
38. Oliveira, C. M. D., Rodrigues, M. N., & Miglino, M. A. (2012). Iron transportation across the placenta. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 1115-1120. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000055>
39. Paschoal, A.M.O., Massara, R.L., Bailey, L.L., Kendall, W.L., Doherty, P.F., Hirsch, A., Chiarello, A.G., Paglia, A.P. (2016). Use of Atlantic Forest protected areas by free-ranging dogs: estimating abundance and persistence of use. *Ecosphere* 7: e01480. <https://doi.org/10.1002/ecs2.1480>
40. Pereira, M. R., de Oliveira Silva, A., Rodrigues, P. H. C., de Oliveira Sales, I., da Silveira, J. A. G., & e Bastos, C. D. V. (2025). First Molecular Evidence of Vertical Transmission of *Ehrlichia canis* in Naturally Infected Female Dogs in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 110674. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110674>
41. Ribeiro, J. M., Rodrigues-Alves, M. L., Oliveira, E., Guimarães, P. P., Santi, A. M. M., Teixeira-Carvalho, A., ... & Souza-Fagundes, E. M. (2022). Pamidronate, a promising repositioning drug to treat *Leishmaniasis*, displays anti*Leishmanial* and immunomodulatory potential. *International Immunopharmacology*, 110, 108952. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108952>
42. Rufino, C. P., Moraes, P. H. G., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D. C. F., McCulloch, J. A., ... & Goncalves, E. C. (2013). Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(12), 846-850. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1303>
43. Savolainen, P., Zhang, Y. P., Luo, J., Lundeberg, J., & Leitner, T. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298(5598), 1610-1613. <https://doi.org/10.1126/science.1073906>

44. Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in parasitology*, 17(2), 74–80. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01856-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01856-0)
45. Silva-Santos, M., Matos, P. T., Lima, V. F. S., Meira-Santos, P. O., & Rocha, L. B. (2014). Micoplasmose em cães: relato de 4 casos. *Enciclopédia Biosfera*, 10(19), 1298-1306.
46. Silveira, J. A., Rabelo, É. M., & Ribeiro, M. F. (2011). Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary parasitology*, 177(1-2), 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.044>
47. Silveira, J. A., Reis, I. A., Estevam, L. G., Pinto, M. C., Zwegarth, E., Passos, L. M., & Paz, G. F. (2017). Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(09), 958-962. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000900010>
48. Silveira, J. A., Valente, P. C., Paes, P. R., Vasconcelos, A. V., Silvestre, B. T., & Ribeiro, M. F. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(3), 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.003>
49. Tasker, S. (2020). Hemotropic *Mycoplasma*. *Clinical Small Animal Internal Medicine*, 927-930. <https://doi.org/10.1002/9781119501237.ch97>
50. Trapp, S. M., Messick, J. B., Vidotto, O., Jojima, F. S., & de Moraes, H. S. A. (2006). *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 177-180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>
51. Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., & Gothe, R. (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 89(3), 241-248. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00202-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00202-8)

5.3 CAPÍTULO 3

Hematological evaluation of pre-parturient female dogs naturally infected by vector-borne pathogens in an urban area of Southeastern Brazil

Mariana Rodrigues Pereira^a, Andressa de Oliveira Silva^c, Pedro Henrique Cotrin Rodrigues^a, Isabela de Oliveira Sales^b; Nicolas Colácio^a; Júlia Angélica Gonçalves da Silveira^a, Camila de Valgas e Bastos^{a*}

^aDepartment of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

^b Médica Veterinária do AME Hospital Veterinário, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^cInstitute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

*Corresponding author: Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Tel: +55 31 3409-2082; e-mail: camilabastos@ufmg.br

Abstract

Understanding the factors that modulate hematological changes in pregnant female dogs is essential for disease prevention, the maintenance of maternal-fetal health, and the reduction of the risk of vertical pathogen transmission. However, knowledge about the influence of hemopathogen infection on gestation in female dogs and on the specific hematological alterations during this physiological period still presents gaps. Thus, this study aimed to investigate hematological changes in female dogs during their antepartum period and their possible association with hemopathogen infections. Forty-three hemograms from pregnant female dogs were analyzed, 100% (43/43) of which had a positive molecular diagnosis for at least one of the following hemopathogens: *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., and hemotropic *Mycoplasma*. Among the evaluated animals, 36.36% (16/43) presented anemia, 40.90% (18/43) leukocytosis, 45.45% (20/43) thrombocytosis, and 63.63% (28/43) monocytosis. Coinfections were frequent, occurring in 83.72% (36/43) of the positive samples with statistical significance. Notably, statistical tests revealed significant differences in

Reticulocyte count and Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) associated with hemotropic *Mycoplasma* infection, and in Lymphocyte count associated with *Ehrlichia* infection. This study provides the first description of hematological changes in pregnant female dogs infected with hemopathogens, establishing an initial reference for the comparison of future hemograms of females in these physiological conditions. Furthermore, it opens avenues to investigate whether the observed alterations result from gestation, infection, or the combination of both factors, and emphasizes the importance for veterinarians to consider the possible influence of hemopathogens on the hematological profile of pregnant female dogs.

Keywords: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, hemotropic *Mycoplasma*, PCR, complete blood count, pregnant dog.

1. Introduction

The gestation period in female dogs is a multifaceted biological condition, marked by hormonal, immunological, and metabolic adaptations aimed at ensuring adequate support for fetal development [1]. The gestation time in female dogs can range from 57 to 72 days, encompassing the period from the first copulation until the moment of parturition, and may vary according to factors such as breed and litter size [2].

Alterations in hematological parameters may occur during gestation, sometimes extending until the antepartum period [3], which can complicate the interpretation of blood tests, especially in identifying diseases or disorders that arise during this period. Cases of normocytic and normochromic anemia in pregnant female dogs have already been described [4], as well as the gradual increase in the number of leukocytes, which can double relative to pre-gestational levels at the time of parturition [5]. However, it is not yet known how many infectious processes during this period may intensify or shape these alterations.

The parturition of a female dog can last from 6 to 12 hours, potentially extending up to 36 hours or more in primiparous female dogs [6]. However, dystocia is a significant reproductive complication that often results in surgical intervention. The literature establishes that certain breeds, especially brachycephalic ones, present cesarean section rates that can exceed 80% due to cephalopelvic disproportion [7]; furthermore, emergency cesarean section is frequently necessary in cases of uterine inertia or failure in the clinical treatment of dystocia [8], which justifies the high incidence of this procedure in veterinary hospitals. The antepartum period is considered one of the moments of greatest stress for both the pregnant [9] potentially

predisposing to immunosuppression and favoring the emergence of clinical signs resulting from the reactivation of latent pathogens [5], including the agents responsible for hemoparasitoses.

Hemopathogens, in turn, represent a diverse group of infectious agents capable of causing diseases in companion animals. They have the tropical lineage brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*: *Rhipicephalus linnaei*, as their main biological vector, and present a relevant challenge within the context of One Health due to their zoonotic potential [10]. In Brazil, the main hemopathogens that affect dogs are the protozoa of the genus *Babesia* and the rickettsiae of the genera *Anaplasma* and *Ehrlichia* [11]. In addition to these, hemoplasmas, also known as hemotropic *Mycoplasmas*, infect the erythrocytes of vertebrate hosts, including dogs, being generally asymptomatic and with a poorly elucidated transmission route [12].

The hematological changes most reported in cases of hemoparasitosis are anemia and thrombocytopenia [13]. Despite the existence of studies addressing hematological and biochemical changes in pregnant female dogs, these investigations are still limited [14,4 and 15]. Furthermore, no studies were found that relate these changes to the presence of hemopathogens, which highlights a gap in scientific knowledge on this subject. Therefore, the present study aims to describe the hematological parameters of female dogs naturally infected with hemopathogens, during their antepartum period.

2. Materials and Methods

The present study included 43 pregnant female dogs, whose characteristics (breed and age group) are detailed in Table 1.

Table 1. Mean, standard deviation, minimum, and maximum values of the ages referring to the female dogs included in the study.

Breeds of the female dogs	N	Mean age (in years) \pm DP	Maximum (years)	Minimum (years)
American Bully	22	2.4 \pm 1.0	5.0	1.0
Bulldog Inglês	2	1.5 \pm 0.7	2.0	1.0
Chihuahua	1	1.0 \pm 1.0	1.0	1.0
Cavalier King Charles Spaniel	1	3.0 \pm 3.0	3.0	3.0
Cane Corso	1	2.0 \pm 2.0	2.0	2.0

Yorkshire Terrier	4	3.3 ± 1.3	5.0	2.0
Staffordshire Bull Terrier	3	2.0 ± 1.2	3.0	1.0
Golden Retriever	7	3.4 ± 1.5	5.0	2.0
Chow Chow	2	1.5 ± 0.7	2.0	1.0

The samples were obtained by convenience sampling at a private veterinary hospital located in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (19°50'45"S, 43°58'21"W). No pre-established criteria were applied for the selection of animals, which were included regardless of their breed, age, or parity, reflecting the patient population received by the hospital. However, for this study, we selected only female dogs positive for any of the agents investigated. All female dogs were admitted for cesarean section surgery at the facility, either due to racial predispositions that made natural birth unfeasible, or as a result of complications associated with difficulty in spontaneous delivery. In the pre-procedure evaluation, veterinarians did not report any clinical alterations or ectoparasitism in the animals.

Upon obtaining informed consent from the owners, whole blood samples from the animals were collected via jugular venous puncture, at the pre-anesthetic moment for the cesarean section, using sterile vacuum tubes containing the anticoagulant EDTA (Ethylenediamine tetra acetic acid). Part of the material was used for hematological analyses, while the remainder was properly stored at -20 °C until the genetic material was extracted for molecular diagnosis of hemopathogens. The collections were performed during the months of March and December 2024.

The study was submitted to and approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CEUA/UFMG) under protocol n° 206/2024.

2.1 Hematological Analysis

Hematological analyses were performed in the hospital's in-house laboratory using the IDEXX ProCyte One automated analyzer (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA), which employs impedance methods to determine the concentration of leukocytes, erythrocytes, and platelets. Hematological parameters were evaluated based on the reference intervals described by [16] and [17]. To analyze the occurrence of anemia in the female dogs, the hematocrit (HCT), with reference values between 37.3% and 61.7%, the red blood cell count (RBC), with an interval of 5.65 to 8.87 million/ul and the hemoglobin concentration (HGB), ranging between 13.1 and 20.5 g/dL, were considered. The bone marrow's responsiveness to

anemia was assessed by the reticulocyte count (RETIC), considering the interval of 10 to 110 K/ul.

For the platelet count (PLAQ), the interval of 148 to 484 K/ul was adopted, while the total leukocyte count (WBC) followed reference values between 5.05 and 16.76 K/ul. Furthermore, hematological counts were confirmed by the blood smear examination, used to verify the actual platelet count and evaluate cell morphology, reducing potential errors resulting from platelet aggregation. The smear also allowed for the observation of young cells, such as band neutrophils, and the visualization of intracellular hemoparasites, including forms compatible with *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia vogeli*, complementing the laboratory analyses and reinforcing diagnostic accuracy.

2.2 Molecular Analysis

Molecular analyses for the detection of hemopathogens were conducted at the Laboratory of Veterinary Protozoology (ProtoVet) affiliated with the Federal University of Minas Gerais (UFMG). DNA was extracted from 300ul of blood using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of the extracted genetic material were evaluated using a NanoDrop spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, Vermont, USA).

The presence of PCR inhibitors was ruled out by the amplification of a fragment of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) gene present in mammals, as described by [18]. Additionally, nested-PCR (nPCR) reactions were conducted to detect agents of the Order Piroplasmida, genus *Babesia*, and also for hemobacteria of the genera *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp., while conventional PCR (cPCR) reactions were used to generically identify *Mycoplasma* sp. Detailed information on the agents investigated, target genes, primer sequences, amplicon sizes, and respective references are presented in Table 2.

Table 2. Primer sequences that were used to identify genera of rickettsiae, genus of protozoa, and hemoplasmas.

Agents		Primers	Sequences (5'-3')	Target	Fragment (bp)	Reference
Piroplasmida	1st Reaction	RIB-19	CGGGATCCAACCTGGTTGATC CTGCC	18S rRN	1700	[19]
		RIB-20	GAATTCCTTGTTACGACTTCT C	A gene		

	2nd Reacti on	BABru m F	ACCTCACCAGGTCCAGACAG	18S rRN A gene	430	[20]
		BABru m R	GTACAAAGGGCAGGGACGTA			
<i>Ehrlichia</i> sp.	1st Reacti on	N516S CH 1 F	ACGGACAATTGCTTATAGCCT T	16S rRN A gene	1195	[21]
		N516S CH 1 R	ACAACTTTTATGGATTAGCTA AAT			
	2nd Reacti on	N516S CH 2 F	GGGCACGTAGGTGGACTAG	16S rRN A gene	443	[21]
		N516S CH 2 R	CCTGTTAGGAGGGATACGAC			
<i>Anaplasma</i> sp.	1st Reacti on	GE3a	CACATGCAAGTCGAACGGAT TATTC	16S rRN A gene	932	[22]
		GE10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAAT CTCC			
	2nd Reacti on	GE9f	AACGGATTATTCTTTATAGCT TGCT	16S rRN A gene	546	[22]
		GE2	GGCAGTATTAAGCAGCTC CAGG			
<i>Hemotropic</i> <i>Mycoplasma</i>		HBTF	ATACGGCCCATATTCCTACG	16S rRN A gene	618	[23]
		HBTR	TGCTCCACCACTTGTTCA			
Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (<i>gapdh</i>)		GAPD H F	CCTTCATTGACCTCAACTACA T	<i>gapd</i> <i>h</i> gene	400	[18]
		GAPD H R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC			

In all molecular assays, the reaction mixture for the first PCR round contained 5.0 µL of GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.4 µL of a mixed primer solution (10 mM), and 3.6 µL of nuclease-free water. A volume of 1.0 µL of total DNA was added to the reaction mixture to obtain a final volume of 10 µL. The reaction mixtures for the second-round (nested) PCR assays were similar, except that the template consisted of 1.0 µL of the PCR product from the first reaction. DNA samples previously confirmed as positive for the

target pathogens by sequencing were used as positive controls. PCR amplicons were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel (40 min; 100 V), stained with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized under ultraviolet light.

2.3 Statistical Methodology and Data Analysis

To ensure the consistency of the database, the variables were subjected to a screening process and standardization of decimal separators, resulting in a final set composed of 43 female dogs with complete information.

All statistical analyses were conducted in the R software (version 4.4.2), using the RStudio development environment -version 2025.09.1+401- (R Core Team, 2016). The main packages used included tidyverse (for data manipulation and organization), FactoMineR and factoextra (for multivariate analyses), pheatmap (for heatmap visualization), and vegan (for diversity analyses). The initial inspection of the data verified the organization of the variables and the adequacy of their distributions [25, 26, 27 and 28].

Inferential analysis began with the inspection of the normality distribution of each quantitative variable. The choice of the comparative test was automated based on this result: for variables that presented a normal distribution, the Student's T-Test was applied for comparison of means between infected and non-infected groups; otherwise, the Mann–Whitney Test was used. The level of significance for determining statistical differences was set at $P < 0.05$.

Based on the results of the mean tests, a separate Principal Component Analysis (PCA) was constructed for each hemopathogen, with the aim of reducing data dimensionality and visualizing dispersion. The PCA plots included 95% confidence ellipses that indicated the dispersion and possible overlap between the groups [27].

For the coinfections, analyses were performed using the vegan package: modeling and a PERMANOVA (adonis2) to evaluate the joint effect and the interactions between the four hemopathogens.

3. Results

3.1 Molecular Tests and Hematological Indices Analysis

The molecular assays revealed a high positivity rate. Coinfections were frequent, occurring in 83.72% (36/43) of the positive samples. Among the genus-directed tests, the exclusive positivity for *Babesia* was 6.97% (3/43), while for hemotropic *Mycoplasma* it was 9.30% (4/43). No animal showed exclusive positivity for *Anaplasma* or *Ehrlichia*.

The most prevalent coinfection involved the genera *Anaplasma*, *Babesia*, and *Mycoplasma*, observed in 36.11% (13/36) of the cases, followed by the simultaneous presence of all four genera in 22.22% (8/36). Coinfections involving two pathogens corresponded to 30.55% (11/36) of the positive samples. No associations were observed between *Anaplasma* and *Ehrlichia*, *Mycoplasma* and *Ehrlichia*, or between *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and *Mycoplasma*. Table 3 presents the detailed distribution of single infections and coinfections identified in this study.

Table 3. Distribution of single infections and coinfections by hemopathogens detected in the 43 pregnant female dogs analyzed by PCR.

Hemopathogen	Infected females / Total female dogs
<i>Anaplasma</i> sp.	31 / 43
<i>Babesia</i> sp.	37 / 43
<i>Ehrlichia</i> sp.	13 / 43
<i>Mycoplasma</i> hemotrópico	31 / 43
Coinfected animals / Total coinfections	
Ana+Ehr+Bab+Myc	8 / 36
Ana+Ehr+Bab	1 / 36
Ana+Bab+Myc	13 / 36
Ehr+Bab+Myc	3 / 36
Ana+Bab	7 / 36
Ana+Myc	2 / 36
Ehr+Bab	1 / 36
Bab+Myc	1 / 36
Monoinfected female dogs	
<i>Babesia</i> sp	3 Females
<i>Mycoplasma</i> hemotropico	4 Females

The descriptive analysis of the hematological parameters showed that 31.43% (12/37) of the female dogs positive (n=37) for *Babesia* presented values below the reference limits for the parameters used in classifying anemia—total red blood cell count, hematocrit, and hemoglobin concentration. Among the animals negative (n=7) for this agent, 8.10% (3/7) presented reduced values in these same indices. In the leukogram, 56.75% (21/37) of the

positive female dogs presented leukocytosis, indicating an increase in the total leukocyte count. Among the negative animals, only 8.10% (3/7) exhibited an elevation in the number of these defense cells. Additionally, 43.24% (16/37) of the positive female dogs presented an increase in platelet count above the reference values. Table 4 reflects the variation of these indices for the groups of animals infected and uninfected with *Babesia* spp.

Table 4. Mean, standard deviation, and minimum and maximum values of the hemogram, leukogram, and platelet concentration in the group of female dogs positive and negative for *Babesia* spp.

Variable	Average ± DP	Maximum Value	Minimum Value	Reference Interval
	Infected	Infected	Infected	
	Non – infected	Non – infected	Non – infected	
Red Blood Cells (RBC)	5.6 ± 0.7	7.0	4,1	5.65 - 8.87 M/ul
	5.0 ± 1.4	6.8	3,0	
Hematocrit (HCT)	38.1 ± 4.9	50.0	27,8	37.3 - 61.7%
	33.3 ± 7.8	44.1	21,5	
Hemoglobin (HGB)	13.9 ± 1.7	17.6	9,9	13.1 - 20.5g/dl
	12.3 ± 3.1	16.5	8,0	
Reticulocytes (RETIC)	95.7 ± 71.3	428.3	33,9	10 - 110K/ul
	67.4 ± 18.5	94.2	35,4	
Platelets (PLAQ)	481.7 ± 160.8	846.0	55,0	148 - 484K/ul
	409.3 ± 139.7	543.0	112,0	
White Blood Cells (WBC)	15.2 ± 4.5	23.9	7,4	5.05 - 16.76K/ul
	13.6 ± 6.1	21.0	5,5	
Neutrophils (NEUT)	12.0 ± 4.1	20.6	7,4	2.95 - 11.64K/ul
	9.8 ± 5.2	16.5	1,8	
Monocytes (MONO)	2.0 ± 1.9	11.2	0,7	0.16 - 1.12 K/ul
	1.2 ± 0.8	2.6	0,3	
Lymphocytes (LYMP)	1.5 ± 0.6	2.7	0,6	1.05 - 5.10K/ul
	1.9 ± 0.9	3.1	0,9	

Among the female dogs positive for *Anaplasma* (n = 31), hematological alterations were observed, with 35.48% (11/31) presenting anemia and 32.26% (10/31) demonstrating a regenerative response. Platelet alterations were also frequent, notably thrombocytosis in 54.83% (17/31) of the cases. In the leukogram, 35.48% (11/31) exhibited leukocytosis due to neutrophilia. Among the negative female dogs (n = 13), anemia was present in 38.46% (5/13) of the animals, a regenerative response in 15.38% (2/13), and thrombocytosis in 23.07% (3/13). Regarding leukocytes, 61.53% (8/13) presented leukocytosis and 53.84% (7/13) monocytosis. Table 5 shows the mean values of the indices between female dogs infected and uninfected with *Anaplasma* spp.

Table 5. Mean, standard deviation, and minimum and maximum values of the hemogram, leukogram, and platelet concentration in female dogs positive and negative for *Anaplasma* spp.

Variable	Average ± DP	Maximum Value	Minimum Value	Reference Interval
	Infected	Infected	Infected	
	Non – infected	Non – infected	Non – infected	
Red Blood Cells (RBC)	5.6 ± 0.7	6.8	4.1	5.65 - 8.87 M/ul
	5.3 ± 1.1	7.0	3.0	
Hematocrit (HCT)	38.0 ± 5.3	50.0	27.8	37.3 - 61.7%
	35.6 ± 6.4	43.0	21.5	
Hemoglobin (HGB)	13.9 ± 1.9	17.6	9.9	13.1 - 20.5g/dl
	13.3 ± 2.5	16.0	8.0	
Reticulocytes (RETIC)	98.6 ± 75.0	428.3	33.9	10 - 110K/ul
	73.4 ± 35.6	144.3	34.5	
Platelets (PLAQ)	483.5 ± 177.4	846.0	55.0	148 - 484K/ul
	438.5 ± 98.3	599.0	302.0	
White Blood Cells (WBC)	14.8 ± 4.4	23.9	7.4	5.05 - 16.76K/ul
	15.3 ± 5.6	23.2	5.5	
Neutrophils (NEUT)	11.6 ± 3.9	20.6	4.2	2.95 - 11.64K/ul
	11.7 ± 5.2	19.7	1.8	
Monocytes (MONO)	2.1 ± 2.1	11.2	0.7	0.16 - 1.12 K/ul

	1.4 ± 0.7	2.5	0.3	
Lymphocytes (LYMP)	1.5 ± 0.5	2.7	0.6	1.05 - 5.10K/ul
	1.7 ± 0.8	3.1	0.7	

In female dogs positive for *Ehrlichia* (n = 13), the most frequent hematological alterations were leukocytosis, thrombocytosis, and monocytosis, all observed in 53.84% (7/13) of the animals. Anemia and reticulocytosis occurred in 46.15% (6/13). Among the 31 negative female dogs, similar alterations were observed, notably monocytosis in 70.96% (22/31), thrombocytosis in 41.93% (13/31), and leukocytosis in 38.70% (12/31). Anemia was identified in 32.25% (10/31) and reticulocytosis in 19.35% (6/31). Table 6 shows the mean values of the indices between female dogs infected and uninfected with *Ehrlichia* spp.

Table 6. Mean, standard deviation, and minimum and maximum values of the hemogram, leukogram, and platelet concentration in female dogs positive and negative for *Ehrlichia* spp.

Variable	Average ± DP	Maximum Value	Minimum Value	Reference Interval
	Infected	Infected	Infected	
	Non – infected	Non – infected	Non – infected	
Red Blood Cells (RBC)	5.5 ± 0.8	7.0	4,1	5.65 - 8.87 M/ul
	5.5 ± 0.9	6.8	3,0	
Hematocrit (HCT)	36.6 ± 4.5	43.0	27,9	37.3 - 61.7%
	37.6 ± 6.1	50.0	21,5	
Hemoglobin (HGB)	13.6 ± 1.6	16.0	10,7	13.1 - 20.5g/dl
	13.7 ± 2.2	17.6	8,0	
Reticulocytes (RETIC)	117.8 ± 102.6	428.3	34,5	10 - 110K/ul
	80.0 ± 41.0	198.2	33,9	
Platelets (PLAQ)	461 ± 193.3	846.0	55,0	148 - 484K/ul
	474.0 ± 144.7	811.0	112,0	
White Blood Cells (WBC)	16.7 ± 4.6	23.9	7,6	5.05 - 16.76K/ul
	14.2 ± 4.6	21.8	5,5	
Neutrophils (NEUT)	13.5 ± 4.3	20.6	2,7	2.95 - 11.64K/ul

	10.8 ± 4.1	16.6	1,8	
Monocytes (MONO)	1.4 ± 0.6	2.7	0,7	0.16 - 1.12 K/ul
	2.1 ± 2.1	11.2	0,3	
Lymphocytes (LYMP)	1.3 ± 0.7	2.7	0,6	1.05 - 5.10K/ul
	1.7 ± 0.6	3.1	0,7	

In the group of female dogs positive for hemotropic *Mycoplasma* (n = 31), hematological alterations were observed in different parameters. Of these, 38.7% (12/31) presented anemia, 35.48% (11/31) reticulocytosis, and 54.8% (17/31) showed thrombocytosis, while only one female dog (3.2%) presented thrombocytopenia. Monocytosis was one of the most frequent alterations, occurring in 70.9% (22/31) of the positive animals, and lymphopenia was observed in 29.0% (9/31). Among the negative female dogs (n = 13), 30.7% (4/13) presented anemia and 46.1% (6/13) leukocytosis; no negative animal presented leucopenia, and monocytosis was recorded in 69.2% (9/13) of the samples. Table 7 shows the mean values for these indices in the group infected and uninfected with hemotropic *Mycoplasma*.

Table 7. Mean, standard deviation, and minimum and maximum values of the hemogram, leukogram, and platelet concentration in female dogs positive and negative for hemoplasmas.

Variable	Average ± DP	Maximum Value	Minimum Value	Reference Interval
	Infected	Infected	Infected	
	Non – infected	Non – infected	Non – infected	
Red Blood Cells (RBC)	5.4 ± 0.8	7.0	3.0	5.65 - 8.87 M/ul
	5.6 ± 1.0	6.7	3.6	
Hematocrit (HCT)	36.6 ± 5.1	44.1	21.5	37.3 - 61.7%
	38.9 ± 6.8	50.0	25.7	
Hemoglobin (HGB)	13.6 ± 1.8	16.5	8.0	13.1 - 20.5g/dl
	13.9 ± 2.7	17.6	8.3	
Reticulocytes (RETIC)	103.3 ± 74.6	428.3	33.9	10 - 110K/ul
	621 ± 24.9	142.2	43.1	
Platelets (PLAQ)	494.0 ± 155.4	846.0	112.0	148 - 484K/ul

	413.2 ± 156.2	676.0	55.0	
White Blood Cells (WBC)	15.3 ± 4.8	23.9	5.5	5.05 - 16.76K/ul
	14.0 ± 4.7	20.0	5.7	
Neutrophils (NEUT)	11.9 ± 4.3	20.6	1.8	2.95 - 11.64K/ul
	11.0 ± 4.4	16.2	4.2	
Monocytes (MONO)	1.6 ± 1.2	6.7	0.5	0.16 - 1.12 K/ul
	2.5 ± 2.8	11.2	0.3	
Lymphocytes (LYMP)	1.6 ± 0.7	3.1	0.6	1.05 - 5.10K/ul
	1.5 ± 0.5	2.3	0.6	

Finally, for the coinfecting animals (n=36), the analysis showed wide variability, presenting a mean red blood cell count below the reference value. The hematocrit (HCT) and hemoglobin (HGB) values were within the normal range; however, the presence of minimum HCT values at 25.7% and HGB at 8.3 g/dL confirms cases of anemia, with a wide dispersion indicated by the elevated standard deviation (SD). The same pattern occurred with the numbers related to reticulocytes.

In the white blood cell lineage, the mean leukocyte count (WBC) exceeded the maximum reference limit, characterizing an average leukocytosis. This increase was primarily attributed to neutrophils and monocytes, whose means exceeded the maximum reference limit. The mean platelet count was close to the maximum limit of the reference interval, with discrepant maximum and minimum values evidencing the simultaneous presence of cases of severe thrombocytopenia and thrombocytosis, as demonstrated in Table 8.

Table 8. Mean, standard deviation, and minimum and maximum values of the hemogram, leukogram, and platelet concentration in female dogs coinfecting with more than one hemopathogen.

Variable	Average ± DP	Maximum Value	Minimum Value	Reference Interval
Red Blood Cells (RBC)	5.5 ± 0.8	7.0	3.6	5.65 - 8.87 M/ul
Hematocrit (HCT)	37.7 ± 5.3	50.0	25.7	37.3 - 61.7%
Hemoglobin (HGB)	13.8 ± 2.0	17.6	8.3	13.1 - 20.5g/dl
Reticulocytes (RETIC)	94.5 ± 70.7	438.3	33.9	10 - 110K/ul

Platelets (PLAQ)	473.4 ± 168.2	846.0	55.0	148 - 484K/ul
White Blood Cells (WBC)	17.3 ± 4.0	23.9	13.6	5.05 - 16.76K/ul
Neutrophils (NEUT)	11.5 ± 4.2	20.6	4.2	2.95 - 11.64K/ul
Monocytes (MONO)	1.9 ± 2.0	11.2	0.3	0.16 - 1.12 K/ul
Lymphocytes (LYMP)	1.5 ± 0.6	2.7	0.6	1.05 - 5.10K/ul

3.2 Statistical Tests

The comparison of means tests (Student's t-test and Mann–Whitney) revealed that hemopathogen infection is associated with significant alterations in specific hematological parameters. For *Ehrlichia*, a significant difference was observed in the Lymphocyte count (LYMP), with positive animals presenting reduced values. *Anaplasma* infection demonstrated a significant increase in Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC, P = 0.028), while hemotropic *Mycoplasma* presented a statistically significant elevation in Reticulocytes (RETIC, P = 0.008) and Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH, P = 0.012). No other hematological variable presented a statistically significant difference between the groups (Table 9).

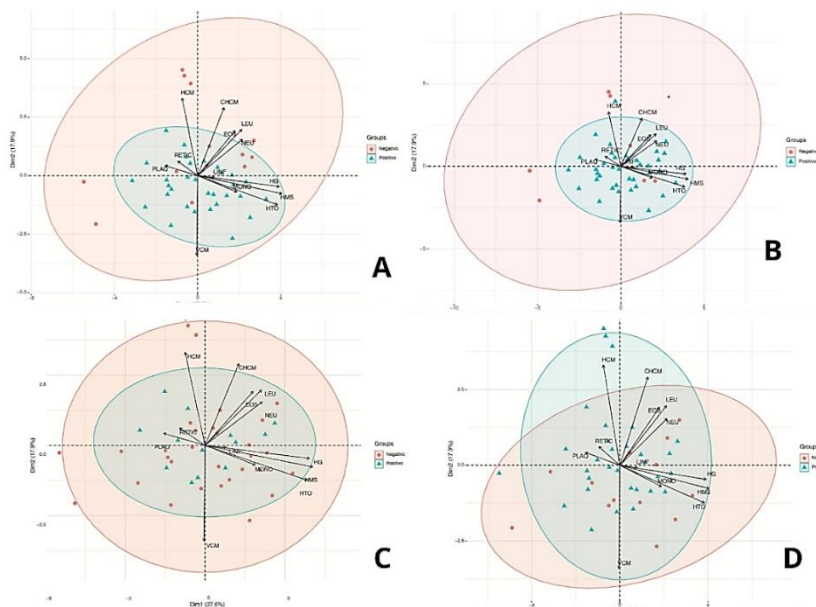
Table 9. P-values of the Student's t-tests and Mann–Whitney tests in the evaluation of hematological variables per hemopathogen.

Variável	<i>Ehrlichia sp</i>		<i>Babesia sp</i>		<i>Anaplasma sp</i>		<i>Mycoplasma hemotópico</i>	
	Teste	P - valor	Teste	P - valor	Teste	P - valor	Teste	P - valor
RBC	T – test	0.9026	T- test	0.3412	T-test	0.3851	T-test	0.4808
HCT	T – test	0.5426	T- test	0.1659	T-test	0.2456	T-test	0.29
HGB	Mann-Whitney	0.6249	T- test	0.2182	Mann-Whitney	0.69	T-test	0.7119
VCM	Mann-Whitney	0.6618	Mann-Whitney	0.2895	Mann-Whitney	0.5368	Mann-Whitney	0.3218
HCM	Mann-Whitney	0.8773	Mann-Whitney	0.2682	Mann-Whitney	0.1165	Mann-Whitney	0.0126*
CHCM	T – test	0.7068	Mann-Whitney	0.3948	T-test	0.0283*	Mann-Whitney	0.2415

RETIC	Mann-Whitney	0.2367	Mann-Whitney	0.5421	Mann-Whitney	0.3283	Mann-Whitney	0.0087*
PLAQ	T - test	0.8297	Mann-Whitney	0.4131	T-test	0.2899	T-test	0.1314
WBC	T- test	0.1146	T-test	0.5485	Mann-Whitney	0.5036	T-test	0.4276
NEUT	T – test	0.0668	T-test	0.336	T-test	0.9702	T-test	0.5567
MONO	Mann-Whitney	0.3283	Mann-Whitney	0.2415	Mann-Whitney	0.4104	Mann-Whitney	0.3095
LYMP	Mann-Whitney	0.0236*	Mann-Whitney	0.2896	Mann-Whitney	0.6069	Mann-Whitney	0.9765

Despite the punctual statistical differences, the Principal Component Analyses (PCA) did not evidence clear separations or groupings between the positive and negative samples for each hemopathogen within the hematological dataset (Figure 1).

Figure 1. PCA analyses performed to verify groupings between positive and negative samples for each hemopathogen: A (*Anaplasma*); B (*Babesia*); C (*Ehrlichia*), D (*Mycoplasma*).



Regarding coinfections, the variable with the lowest P-value of the entire study was the Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), which showed a significant difference ($P = 0.0003$) in *Babesia* + *Mycoplasma* coinfection. The Mean Corpuscular Volume (MCV) also demonstrated sensitivity to the associations, with an increase in the associations between

Babesia + Anaplasma ($P = 0.0429$), *Ehrlichia + Anaplasma* ($P = 0.0055$) and *Ehrlichia + Anaplasma + Mycoplasma* ($P = 0.0218$). Similarly, Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) presented a significant alteration in the *Ehrlichia + Mycoplasma* coinfection ($P = 0.0075$) and in the triple infection *Ehrlichia + Anaplasma + Mycoplasma* ($P = 0.0037$). In the white blood cell lineage, *Babesia + Mycoplasma* was associated with a significant difference in the Leukocyte count ($P = 0.0412$), while *Ehrlichia + Mycoplasma* resulted in a significant difference ($P = 0.0232$) in Neutrophils (Table 10).

Table 10. Synthesis of the significant hematological variables by coinfection in the permanova analysis.

COINFECCÕES			
Variables	Associated Pathogens	Teste	P - valor
VCM	<i>Babesia + Anaplasma</i>	Permanova	0.0429
VCM	<i>Ehrlichia + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0055
VCM	<i>Ehrlichia + Anaplasma + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0218
HCM	<i>Ehrlichia + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0075
HCM	<i>Anaplasma + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0037
HCM	<i>Ehrlichia + Anaplasma + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0360
CHCM	<i>Babesia + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0003
WBC	<i>Ehrlichia + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0412
NEUT	<i>Ehrlichia + Mycoplasma</i>	Permanova	0.0232

4. Discussion

The present study constitutes one of the first approaches to investigate, in an integrated manner, the presence of hemopathogens and hematological alterations in female dogs during the pre-partum period—a phase physiologically characterized by intense hematological and immunological modifications [29]. The high molecular positivity of hemoparasites observed (97.72%) reflects the exposure of the females to tick-borne agents. Previous studies conducted in Belo Horizonte corroborate these findings, evidencing the frequent occurrence of *Anaplasma*, *Babesia*, and *Ehrlichia*, associated with clinical manifestations of different intensities—including fever, apathy, and lymphadenomegaly—and with hematological changes, such as anemia and thrombocytopenia [30,31 and 32]. Furthermore, in the case of pregnant animals, the physiological changes in the immune system, which are necessary to

maintain tolerance to the fetus, may increase the risk of recrudescence of chronic pathogens, resulting in parasite loads high enough for detection by direct tests [33].

In this context, it was observed that anemia, thrombocytosis, leukocytosis, and monocytosis were the most frequent hematological alterations in this study, occurring in 36.36%, 45.45%, 40.90%, and 63.63% of the evaluated female dogs, respectively.

Infection with *Mycoplasma* (hemoplasmas), for example, impacted the hematological variables of the pregnant female dogs. There was a significant increase in the reticulocyte count (RETIC; $P = 0.0087$) and in the mean corpuscular hemoglobin (MCH; $P = 0.0126$). This association is compatible with the classic pattern of regenerative hemolytic anemia. The pathogenesis of hemoplasmas is related to adhesion and direct damage to the erythrocyte membrane, which triggers immune-mediated hemolysis. In response, the bone marrow intensifies erythropoiesis, releasing a high number of reticulocytes—immature cells that are larger and have a higher hemoglobin content—thus justifying the observed increases in the RETIC and MCH parameters [34]. In cases of physiological anemia in pregnant animals, the expansion of plasma volume can lead to hemodilution, resulting in a reduction in hematocrit values. [35] described the occurrence of normocytic and normochromic anemia in pregnant female dogs, associating it with hemodilution and a decrease in erythrocyte lifespan. However, these authors did not rule out the influence of hemoparasitosis as possible additional factors capable of aggravating or triggering the anemic process.

The present data evidenced an increase in leukocytes and neutrophils in pregnant female dogs negative and positive for *Ehrlichia*, with both averages close to the upper limit, a fact that corroborates other findings of the gestational period [36]. However, statistically evident, the only significant alteration for *Ehrlichia* was the reduction in the lymphocyte count ($P = 0.0236$), a finding that aligns with the lymphopenia observed in the acute and subclinical phases of the disease [37]. The pathogenesis of this agent involves the alteration of cytokines that lead to lymphocyte apoptosis and myelosuppression, which explains the decrease in this cell line and suggests that the process, in this case, is pathological and induced by the agent [38].

For *Anaplasma*, the only significant difference observed was the increase in mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ($P = 0.0283$). Although the agent's pathogenesis is associated with cyclic thrombocytopenia, this increase in MCHC may indicate subtle changes in erythrocyte morphology or hemoglobin distribution, possibly related to chronic inflammatory processes or hemoconcentration [39]. However, given the low statistical significance of this variable, it is likely that infection with this *Rickettsia* did not induce a marked hematological response in the evaluated population.

Although the means of the evaluated parameters remained close to the reference values and without significant differences between the positive and negative groups, the standard deviations indicate heterogeneity within the groups. This variation may be related, in part, to the discrepancy in sample size between groups, as the number of positive female dogs was almost double that of negative ones, except for *Ehrlichia*, where this relationship was reversed. Such imbalances limit individual interpretation and result in few significant differences in hematological parameters when facing each agent investigated.

Despite being a hemolytic agent, isolated *Babesia* infection did not demonstrate a significant difference in any of the hematological parameters evaluated when comparing positive and negative female dogs ($P > 0.05$ for all indices). This fact can be attributed to the low parasitic load or the disease stage (acute or subclinical), which may not be severe enough to cause detectable systemic changes in a cross-sectional study [40]. However, the pathological relevance of this agent was demonstrated in the *Babesia + Mycoplasma* coinfection, resulting in the lowest P-value of the entire study (MCHC, $P = 0.0003$). This finding is evidence of the combined effect of two erythrocytic agents.

The frequency of statistically significant alterations observed in coinfections (83.72%) supports the hypothesis that these associations intensify the hematological variations of the infections. Similar to the result found in the *Mycoplasma* infection, the permanova test evidenced a significant difference in indices such as MCV, MCH, and MCHC in coinfections, demonstrating that the infection is inducing morphological changes in red blood cells, an event that is not characteristic of adaptive responses in pregnancy. Coupled with this, the statistical significance related to leukocytosis due to neutrophilia in coinfections ($P < 0.05$) demonstrates that the inflammatory process is exacerbated, exceeding the common physiological stimulus during pregnancy.

A methodological limitation is the absence of complete information in the clinical records provided by the clinic, such as the mode of mating (artificial or natural insemination), the deworming and vaccination protocol, and the reproductive status (primiparous or multiparous). Furthermore, the lack of a control group with a significant N of pregnant female dogs negative for hemoparasites is a limitation that prevents direct and definitive comparisons of hematological alterations attributed exclusively to gestation or to infection. Additionally, the large variation in the number of individuals within each single-infection group (due to the high prevalence of coinfections, 83.72%) resulted in a larger standard deviation for some hematological parameters. This high internal dispersion justifies the absence of significance in

many single-agent analyses. Finally, the cross-sectional nature of the study restricts causal inferences between the presence of hemopathogens and the observed hematological alterations.

5. Conclusion

This study demonstrated that hemopathogen infections in pregnant female dogs exert a significant impact on specific hematological variables, exceeding the alterations physiologically expected for gestation. While pregnancy alone induces a numerical anemia with a normocytic and normochromic profile, the infections and coinfections resulted in distinct pathological patterns, such as macrocytic regenerative anemia (evidenced by the increase in RETIC, MCV, MCH, and MCHC) and lymphopenia associated with *Ehrlichia*.

The findings allow us to suggest that the high combined pathogenic load is the factor that potentiates hematological deviations in pregnant female dogs, intensifying inflammatory and regenerative responses. Such findings may serve as a clinical alert for the routine screening of hemopathogens in female dogs, particularly in the pre- and post-partum periods. The immediate application of molecular diagnostics for hemoparasites in these situations enables timely therapeutic decisions, which is crucial for accelerating the clinical recovery of female dogs debilitated by natural birth, C-section, and lactation.

Future longitudinal studies with robust control groups are essential to isolate the impact of infection from that of gestation.

Conflict of interest

The authors declare that they have no financial, commercial, or any other conflicts of interest that could influence the results or interpretation of the data presented in this study.

Author contributions

Mariana Rodrigues Pereira: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft.; **Andressa de Oliveira Silva:** Conceptualization, Investigation, Resources.; **Pedro Henrique Cotrin Rodrigues:** Conceptualization, Methodology, Resources.; **Nicolas colácio:** Conceptualization.; **Isabela de Oliveira Sales:** Conceptualization.; **Júlia Angélica Gonçalves da Silveira:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources, Funding acquisition, Visualization, Supervision, Writing - Original Draft, Writing - review & editing.; **Camila de Valgas e Bastos:** Writing, Validation, Formal analysis, supervision, review e editing.

Funding

This study was financed by scholarships from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), with financial support for fieldwork and laboratory activities, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (315466/2021-9; CNPq/SECTICS/CAPES/FAPs no 46/2024 and 308527/2025–9), the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) (APQ-00708-21; APQ-02531–24), the Graduate Program in Animal Science at UFMG, and the Federal University of Minas Gerai

References

- [1] Concannon, P. W. (1986). Canine pregnancy and parturition. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 16(3), 453-475. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(86\)50053-X](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(86)50053-X)
- [2] Johnson, C. A. (2008). Pregnancy management in the bitch. *Theriogenology*, 70(9), 1412-1417. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.009>
- [3] Awodu, O. A., Enosolease, M. E., Ubaru, A. G., & Famodu, A. A. (2002). Leucocyte counts in pregnant Nigerian women with sickle cell trait. *African journal of reproductive health*, 112-116. <https://doi.org/10.2307/3583264>
- [4] Concannon, Patrick W. "Physiology and clinical parameters of pregnancy in dogs." *Proceedings of 27th Annual Congress of the WSAVA*. 2002.
- [5] Feliciano, M. A. R., et al. "Imunologia na gestação de cadelas: revisão de literatura." *Revta Bras. Reprod. Anim* 36 (2012): 162-158.
- [6] De Cramer, Kurt Guido Mireille. Preparturient caesarean section in the bitch: justification, timing, execution and outcome evaluation. University of Pretoria (South Africa), 2017.
- [7] Uchańska, O., Ochota, M., Eberhardt, M., & Nizański, W. (2022). Dead or alive? A review of perinatal factors that determine canine neonatal viability. *Animals*, 12(11), 1402. <https://doi.org/10.3390/ani12111402>
- [8] Luz, M. R., Münnich, A., & Vannucchi, C. I. (2015). Novos enfoques na distocia em cadelas. *Rev. bras. reprod. anim*, 39, 354-361.
- [9] Bastos, V.A (2021). Avaliação laboratorial e do cortisol materno e fetal em cadelas parturientes com diferentes tamanhos de ninhadas.
- [10] Azmi, Shagufta, Maneesh Sharma, and N. Sudhan. "Canine ehrlichiosis: an overview." *Indian J Canine Pract* 5 (2013): 95.
- [11] Malheiros, J., et al. "Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil." *Ticks and tick-borne diseases* 7.5 (2016): 900-893. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>

- [12] Baltazar, F. N., et al. "Ocorrência e características clínicas e laboratoriais de cães infectados por micoplasmas hemotrópicos (*Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*): estudo de quatro anos em animais atendidos em hospital veterinário localizado no município de São Paulo, Brasil." *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP* 14.2 (2016): 29-26.
- [13] Moraes, Naiari do Carmo, et al. "Clinical and hematological aspects of dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. and *Leptospira interrogans*." *Biosci. j.(Online)* (2011): 459-452.
- [14] De Cramer, K. G. M., K. E. Joubert, and J. O. Nöthling. "Hematocrit changes in healthy periparturient bitches that underwent elective cesarean section." *Theriogenology* 86.5 (2016): 1340-1333. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.075>
- [15] Hayashi, M. "Composition of the blood of adult Beagle bitches during the estrous cycle, pregnancy and postpartum period." *Japanese Journal of Animal Reproduction* 20 (1974).
- [16] Jain, N. C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*.
- [17] Weiss, D. J., & Wardrop, K. J. (Eds.). (2011). *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons.
- [18] Birkenheuer, Adam J., Michael G. Levy, and Edward B. Breitschwerdt. "Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples." *Journal of clinical microbiology* 41.9 (2003): 4177-4172. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>
- [19] Zahler, M.; Rinder, H.; Schein, E.; Gothe, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.* 2000, 89, 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00202-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00202-8)
- [20] da Silveira, Júlia AG, Élide ML Rabelo, and Múcio FB Ribeiro. "Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil." *Veterinary parasitology* 177.1-2 (2011): 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.044>
- [21] Kawahara, Makoto, et al. "*Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan." *Emerging Infectious Diseases* 15.12 (2009): 1991. <https://doi.org/10.3201/eid1512.081667>
- [22] Massung, Robert F., et al. "Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae." *Journal of clinical microbiology* 36.4 (1998): 1090-1095. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1090-1095.1998>
- [23] Criado-Fornelio, A.; Martinez-Marcos, A.; Buling-Saraña, A.; Barba-Carretero, J.C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats

- from southern Europe: A molecular study. *Vet. Microbiol.* 2003, 93, 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0)
- [24] R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- [25] Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D. A., François, R., ... & Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of open source software*, 4(43), 1686.
- [26] Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software*, 25, 1-18.
- [27] Kassambara, A., & Mundt, F. (2016). Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. *CRAN: Contributed Packages*.
- [28] Oksanen, J. (2015). Vegan: community ecology package. R package version, 2, 3.
- [29] Olsson, K., et al. "Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F_{2α} metabolite during labour in the dog." *Acta Physiologica Scandinavica* 179.3 (2003): 281-287. <https://doi.org/10.1046/j.0001-6772.2003.01178.x>
- [30] Costa-Júnior, L. M., et al. "Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil." *Preventive Veterinary Medicine* 109.3-4 (2013): 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011>
- [31] de Valgas E Bastos, C., Moreira, S. M., & Passos, L. M. F. (2004). Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 158-160.
- [32] Moreira, S. M., Bastos, C. V., Araújo, R. B., Santos, M., & Passos, L. M. F. (2003). Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55, 141-147. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000200003>
- [33] Abu-Raya, B., Michalski, C., Sadarangani, M., & Lavoie, P. M. (2020). Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Frontiers in immunology*, 11, 575197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197>
- [34] Messick, J. B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 2-13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>
- [35] Dimco, Elenica, et al. "Effect of pregnancy in hematological profile of dogs." *Albanian Journal of Agricultural Sciences* 12.2 (2013).
- [36] Feldman, E. C., Nelson, R. W., Reusch, C., & Scott-Moncrieff, J. C. (2014). *Canine and Feline Endocrinology-e-book*. Elsevier health sciences.

- [37] Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., & Cornelissen, A. W. (2001). Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary parasitology*, 95(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00407-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00407-6)
- [38] Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296.
- [39] Gaunt, S. D., Beall, M. J., Stillman, B. A., Lorentzen, L., Diniz, P. P. V. P., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. B. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & vectors*, 3(1), 33.
- [40] Irwin, P. J. (2010). Canine babesiosis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(6), 1141-1156.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os achados obtidos neste estudo sustentam, a ocorrência de evidência molecular de transmissão vertical de *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, além de confirmarem a transmissão já previamente relatada de *Anaplasma platys*. Esses achados destacam a relevância da via vertical transplacentária na disseminação e manutenção desses agentes, inclusive em ambientes onde não há, ainda que temporariamente, a presença de vetores artrópodes. O trabalho também evidencia a necessidade de desenvolver novas estratégias de controle, complementares às já existentes, que atualmente se concentram no combate ao carrapato, além de ressaltar a importância de medidas preventivas com foco no diagnóstico precoce e monitoramento desses agentes em animais reprodutores. Adicionalmente, os resultados reforçam a necessidade de acompanhamento longitudinal dos filhotes que já nascem infectados, a fim de compreender a dinâmica desses patógenos ao longo da vida do animal, bem como os possíveis impactos da infecção precoce sobre a resposta imunológica frente a desafios ambientais subsequentes, a manifestação clínica da doença e a gravidade dos quadros associados.

Os cães são animais próximos aos seres humanos, frequentemente considerados membros das famílias modernas, ressaltando assim a importância da manutenção da saúde desses animais. Apesar da alta prevalência de hemopatógenos em cães no país, as implicações clínicas e hematológicas dessas infecções em cadelas gestantes ainda não foram devidamente elucidadas. Dessa forma, são necessários estudos adicionais para que se possa estabelecer uma

associação precisa entre os achados hematológicos e clínicos observados e o período gestacional.

7. CONCLUSÕES

- Comprovou-se, somente por biologia molecular, a via transplacentária como relevante via de transmissão para os hemopatógenos: *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Mycoplasma Haematoparvum* em amostras fetais e de neonatos.
- Não foi detectada positividade em nenhuma amostra investigada para *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania* spp. e *Hepatozoon* spp.
- A pesquisa direta por esfregaço sanguíneo das amostras de sangue das 51 cadelas foi negativa para todos os hemoparasitos investigados.
- Observou-se uma elevada taxa de coinfeção em todos os materiais analisados. A associação mais frequente envolveu agentes dos gêneros *Anaplasma*, *Mycoplasma* e Piroplasmida, detectada em 16/51 amostras de sangue total de cadelas (31,4%). Em seguida, identificou-se a coinfeção pelos mesmos agentes com a inclusão de *Ehrlichia*, presente em 8/51 amostras do mesmo material (15,7%).
- Foram identificadas coinfeções associadas à transmissão vertical confirmada em pools de órgãos e em amostras de neonatos. A associação mais frequente ocorreu entre *Anaplasma*, *Mycoplasma* e Piroplasmida, detectada em 6/13 pools de órgãos (46,2%). Adicionalmente, no sangue dos neonatos, observou-se coinfeção envolvendo *Mycoplasma* e Piroplasmida em 3/15 amostras (20,0%).
- Foram 23 (45,1%) ninhadas positivas para pelo menos um dos hemopatógenos pesquisados. 47,8% apresentaram apenas um neonato infectado, 30,4% apresentaram dois neonatos infectados e 21,7% apresentaram três neonatos infectados, evidenciando um padrão heterogêneo de infecção intra-ninhada (Resultado mais bem detalhado nas tabelas do material suplementar).
- Identificou-se que, dentro de uma mesma ninhada, nasceram animais positivos e negativos para os hemopatógenos. Contudo, como as ninhadas não foram acompanhadas longitudinalmente, não foi possível avaliar as implicações desses achados a longo prazo (Tabelas I, II e III do material suplementar).

- O estudo descreve pela primeira vez alterações hematológicas em cadelas prenhes infectadas por hemopatógenos, não sendo possível associar exclusivamente as alterações hematológicas às infecções, sendo necessários novos estudos comparativos com cadelas prenhes infectadas e não infectadas.

REFERÊNCIAS

- Adachi, k., Tateishi, m., Horii, y., Nagatomo, h., Shimizu, t., & makimura, s. (1994). Reactivity of serum anti-erythrocyte membrane antibody in Babesia gibsoni-infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56(5), 997-999. <https://doi.org/10.1292/jvms.56.997>
- Alencar, N. X., Kohayagawa, A., & Santarém, V. A. (1997). Hepatozoon canis infection of wild carnivores in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 70(4), 279-282. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01119-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01119-3)
- Almeida, A. D. B. D., Paula, D. D., Dahroug, M. A. A., Freitas, A. D., Silva, J. D., Dutra, V., ... & Sousa, V. R. F. (2012). *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks of dogs in Cuiaba, Mato Grosso.
- Altay, K., Sahin, O. F., Erol, U., & Aytmirzakizi, A. (2023). First molecular detection and phylogenetic analysis of Mycoplasma wenyonii and Candidatus Mycoplasma haemobos in cattle in different parts of Kyrgyzstan. *Biologia*, 78(2), 633-640. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01292-4>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alves, T. B., Faggion, S. A., Santos, E. V., Roberto, P. G., França, S. C., Fachin, A. L., & Marins, M. (2014). Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(2), 333-336.
- Ambrósio, C. E. *et al.* Development biology in dogs: Behavior of embryo/fetus related to placenta. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.6, p.133, 2009. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/p133.pdf>
- Anderson, J. W. (1969). Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog I. The placental labyrinth. *The Anatomical Record*, 165(1), 15-35. <https://doi.org/10.1002/ar.1091650103>
- Andrade, L. S., de Souza, R. S., de Araujo, A. C., de Oliveira Silva, S., Melo, M. N., Melo, F. G., ... & Silveira, J. A. G. (2024). Hemopathogens in naturally infected bovine fetuses in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 15(5), 102351. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2024.102351>
- André, M. R. (2018). Diversity of Anaplasma and Ehrlichia/Neoehrlichia agents in terrestrial wild carnivores worldwide: implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. *Frontiers in veterinary science*, 5, 293. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00293>

- André, M. R. (2018). Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/NeoEhrlichia* agents in terrestrial wild carnivores worldwide: implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. *Frontiers in veterinary science*, 5, 293. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00293>
- Assarasakorn, S., Veir, J. K., Hawley, J. R., Brewer, M. M., Morris, A. K., Hill, A. E., & Lappin, M. R. (2012). Prevalence of Bartonella species, hemoplasmas, and Rickettsia felis DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. *Research in veterinary science*, 93(3), 1213-1216. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.015>
- Baneth, G. A. D., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., & Shkap, V. (2001). Transmission of Hepatozoon canis to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected Rhipicephalus sanguineus ticks. *Journal of Parasitology*, 87(3), 606-611.
- Baneth, G., & Weigler, B. (1997). Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(6), 365-370. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00482.x>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology*, 24(7), 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- 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(1), 27-31. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00016-8)
- Barber, J. S., & Trees, A. J. (1998). Naturally occurring vertical transmission of Neospora caninum in dogs. *International journal for Parasitology*, 28(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00171-9)
- Barker, E. N., Langton, D. A., Helps, C. R., Brown, G., Malik, R., Shaw, S. E., & Tasker, S. (2012). Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote Aboriginal communities in Australia. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 55. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-55>
- Barutzki, D., De Nicola, A., Zeziola, M., & Reule, M. (2006). Seroprevalence of Anaplasma phagocytophilum infection in dogs in Germany. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 119(7-8), 342-347.
- Beall, M. J., Chandrashekar, R., Eberts, M. D., Cyr, K. E., Diniz, P. P. V., Mainville, C., ... & Breitschwerdt, E. B. (2008). Serological and molecular prevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, and Ehrlichia species in dogs from Minnesota. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 455-464. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0236>
- Bevilacqua, P. D., Paixão, H. H., Modena, C. M., & Castro, M. C. P. S. (2001). Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(1), 1-8. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000100001>
- Bezerra, N. M., Teófilo, T. S., Araújo, H. N., Silva, J. B., Moura, G. H., Costa, K. M., ... & Batista, J. S. (2023). Experimental infection by Trypanosoma vivax in goats in the Brazilian

semiarid: detection of *T. vivax* DNA in colostrum and assessment of lactogenic transmission. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 43, e07119. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7119>

Biondo, A. W., Santos, A. P. D., Guimarães, A. M. S., Vieira, R. F. D. C., Vidotto, O., Macieira, D. D. B., ... & Messick, J. B. (2009). A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, 18, 1-7. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01803001>

Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4172-4177.

Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4172-4177. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>

Boechat, V. C., Mendes Junior, A. A. V., Madeira, M. D. F., Ferreira, L. C., Figueiredo, F. B., Rodrigues, F. D. C. D. C., ... & Menezes, R. C. (2016). Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 115(6), 2371-2379.

Böhm, M., Leisewitz, A. L., Thompson, P. N., & Schoeman, J. P. (2006). Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary parasitology*, 141(1-2), 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.002>

Bown, K. J., Lambin, X., Ogden, N. H., Begon, M., Telford, G., Woldehiwet, Z., & Birtles, R. J. (2009). Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerging infectious diseases*, 15(12), 1948. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090178>

Bown, K. J., Lambin, X., Ogden, N. H., Petrovec, M., Shaw, S. E., Woldehiwet, Z., & Birtles, R. J. (2007). High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1771-1776.

Braccini, G. L., Chaplin, E. L., Stobbe, N. S., Araújo, F. A. P., & Santos, N. R. (1992). Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande Do Sul, Brazil, 1986-1990.

Braccini, G. L., Chaplin, E. L., Stobbe, N. S., Araújo, F. A. P., & Santos, N. R. (1992). Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande Do Sul, Brazil, 1986-1990.

Brandão, V. M. D., Barrozo, P. H. M., Sousa, L. O., Santos, R. C. D., Schwanke, K., Sampaio, F. D., ... & Cavalcante, G. G. (2019). Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. *Ciência Rural*, 49(12), e20190414.

Brandão, V. M. D., Barrozo, P. H. M., Sousa, L. O., Santos, R. C. D., Schwanke, K., Sampaio Junior, F. D., ... & Cavalcante, G. G. (2019). Molecular detection of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. *Ciência Rural*, 49, e20190414. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190414>

Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Quorollo, B. A., Saito, T. B., Maggi, R. G., Blanton, L. S., & Bouyer, D. H. (2014). Intravascular persistence of Anaplasma platys, Ehrlichia chaffeensis, and Ehrlichia ewingii DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasites & vectors*, 7(1), 298. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>

Brown, Z. A., Schalekamp-Timmermans, S., Tiemeier, H. W., Hofman, A., Jaddoe, V. W. V., & Steegers, E. A. P. (2014). Fetal sex specific differences in human placentation: a prospective cohort study. *Placenta*, 35(6), 359-364. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.03.014>

Burke, T. M., & Roberson, E. L. (1985). Prenatal and lactational transmission of Toxocara canis and Ancylostoma caninum: experimental infection of the bitch before pregnancy. *International Journal for Parasitology*, 15(1), 71-75. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(85\)90104-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(85)90104-3)

Cannon, S. H., Levy, J. K., Kirk, S. K., Crawford, P. C., Leutenegger, C. M., Shuster, J. J., ... & Chandrashekar, R. (2016). Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. *The Veterinary Journal*, 211, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.02.012>

Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L., & Sykes, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(6), 1129-1141. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x>

Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Carlos, R. S. A., & Albuquerque, G. R. (2008). Epidemiological and molecular study of Ehrlichia canis in dogs in Bahia, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 657-662.

Castro, V. V., Ayres, E. D. C. B. S., Canei, D. H., Pereira, M. E., Sousa, V. R. F., Chitarra, C. S., ... & Almeida, A. D. B. P. F. D. (2020). Molecular prevalence and factors associated with Babesia vogeli infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil. *Ciência Rural*, 50, e20190389.

Chagas, E., Cunha, A. D., Castro, G. O., Ferreira, L. C., & Romana, C. (1938). Leishmaniose visceral americana. *Mem. Inst. O. Cruz*, 33(1), 89-229.

Chastant, S., & Mila, H. (2019). Passive immune transfer in puppies. *Animal Reproduction Science*, 207, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.012>

Chisu, V., Loi, F., Mura, L., Tanda, A., Chessa, G., & Masala, G. (2021). Molecular detection of Theileria sergentii/orientalis/buffeli and Ehrlichia canis from aborted ovine and caprine products in Sardinia, Italy. *Veterinary Medicine and Science*, 7(5), 1762-1768. <https://doi.org/10.1002/vms3.510>

Concannon, P. W. (1986). Canine pregnancy and parturition. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 16(3), 453-475. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(86\)50053-X](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(86)50053-X)

Correa, W. M. (1974). Canine babesiosis: Transplacental transmission.

Costa, A. P. D., Costa, F. B., Labruna, M. B., Silveira, I., Moraes-Filho, J., Soares, J. F., ... & Guerra, R. D. M. S. N. D. C. (2015). A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(1), 28-35.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612015008>

Costa-Júnior, L. M., Rembeck, K., Passos, L. M. F., & Ribeiro, M. F. B. (2013). Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 109(3-4), 321-326.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011>

Costa-Júnior, L. M., Ribeiro, M. F. B., Rembeck, K., Rabelo, E. M. L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., ... & Passos, L. M. F. (2009). Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 257-260.

Costa-Júnior, L. M., Zahler-Rinder, M., Ribeiro, M. F. B., Rembeck, K., Rabelo, E. M. L., Pfister, K., & Passos, L. M. F. (2012). Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 160-163.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.015>

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary microbiology*, 93(4), 307-317.

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary microbiology*, 93(4), 307-317.

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4), 189-201.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00078-5)

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary microbiology*, 93(4), 307-317.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0)

Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J. C., Jefferies, R., & Irwin, P. (2007). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary parasitology*, 144(3-4), 261-269.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.042>

Criado-Fornelio, A., Ruas, J. L., Casado, N., Farias, N. A. R., Soares, M. P., Müller, G., ... & Barba-Carretero, J. C. (2006). New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology*, 92(1), 93-99.

da Silva, A. R., Viana, G. M., Varonil, C., Pires, B., Nascimento Mdo, D., & Costa, J. M. (1997). Visceral leishmaniasis (kala-azar) on Ilha de São Luís, Maranhão. Brazil: its evolution

and outlook. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(5), 359-368. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821997000500002>

da Silva, S. M., Ribeiro, V. M., Ribeiro, R. R., Tafuri, W. L., Melo, M. N., & Michalick, M. S. M. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 166(1-2), 159-162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011>

Dagnone, A. S., Souza, A. I. D., André, M. R., & Machado, R. Z. (2009). Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18, 20-25. <https://doi.org/10.4322/rbvpv.01804004>

Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1, 1-17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in parasitology*, 28(10), 437-446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>

Dantas-Torres, F., Figueredo, L. A., & Brandão-Filho, S. P. (2006). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39, 64-67. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100012>

Dantas-Torres, F., Martins, T. F., Muñoz-Leal, S., Onofrio, V. C., & Barros-Battesti, D. M. (2019). Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(6), 101252. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.012>

Dawson, J. E., Warner, C. K., Baker, V., Ewing, S. A., Stallknecht, D. E., Davidson, W. R., ... & Olson, J. G. (1996). Ehrlichia-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *The Journal of parasitology*, 52-58.

Dawson, J. E., Warner, C. K., Baker, V., Ewing, S. A., Stallknecht, D. E., Davidson, W. R., ... & Olson, J. G. (1996). Ehrlichia-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *The Journal of parasitology*, 52-58. <https://doi.org/10.2307/3284115>

De Cramer, K. G. M., Joubert, K. E., & Nöthling, J. O. (2016). Hematocrit changes in healthy periparturient bitches that underwent elective cesarean section. *Theriogenology*, 86(5), 1333-1340. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.075>

de Faria Valle, S., Messick, J. B., Dos Santos, A. P., Kreutz, L. C., Duda, N. C. B., Machado, G., ... & González, F. H. D. (2014). Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(4), 259-265.

de Freitas Milagres, T., López-de-Felipe, M., da Silva, W. J., Martín-Martín, I., Gálvez, R., & da Silva, O. S. (2023). Same parasite, different outcomes: unraveling the epidemiology of

Leishmania infantum infection in Brazil and Spain. *Trends in Parasitology*, 39(9), 774-785. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.06.008>

De La Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Höfle, U., Fernández De Mera, I. G., Villanúa, D., ... & Gortázar, C. (2005). Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, 5(4), 390-401. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.390>

de la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., & Gortázar, C. (2008). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Research in veterinary science*, 84(3), 382-386.

De Sousa, K. C. M., Calchi, A. C., Herrera, H. M., Dumler, J. S., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., & André, M. R. (2017). Anaplasmatataceae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. *Epidemiology & Infection*, 145(16), 3424-3437.

de Sousa, K. C. M., Fernandes, M. P., Herrera, H. M., Freschi, C. R., Machado, R. Z., & André, M. R. (2018). Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(2), 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.010>

De Tommasi, A. S., Otranto, D., Furlanello, T., Tasca, S., Cantacessi, C., Breitschwerdt, E. B., ... & de Caprariis, D. (2014). Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 7(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0534-2>

de Valgas E Bastos, C., Moreira, S. M., & Passos, L. M. F. (2004). Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 158-160. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.023>

Desjeux, P. (2004). Focus: leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9), 692-692. <https://doi.org/10.1038/nrmicro981>

Dimco, E., Abeshi, J., Lika, E., & Dhamo, G. (2013). Effect of pregnancy in hematological profile of dogs. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 12(2).

Diniz, P. P. V., & de Aguiar, D. M. (2022). Ehrlichiosis and anaplasmosis: An update. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 52(6), 1225-1266. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.002>

Diniz, P. P. V., & de Aguiar, D. M. (2022). Ehrlichiosis and anaplasmosis: An update. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 52(6), 1225-1266. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.002>

do Nascimento, N. C., Santos, A. P., Guimaraes, A. M., SanMiguel, P. J., & Messick, J. B. (2012). *Mycoplasma haemocanis*—the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. *Veterinary research*, 43, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-66>

Duarte, S. C., Linhares, G. F. C., Romanowsky, T. N., da Silveira Neto, O. J., & Borges, L. M.

F. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary parasitology*, 152(1-2), 16-20.

Duarte, S. C., Linhares, G. F. C., Romanowsky, T. N., da Silveira Neto, O. J., & Borges, L. M. F. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary parasitology*, 152(1-2), 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.013>

Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, H. J., Meyersen, A., & Straubinger, R. K. (2012). First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasites & vectors*, 5(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-49>

El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575-579.

Feliciano, M. A. R., Aquino, A. A., Coutinho, L. N., & Vicente, W. R. R. (2012). Imunologia na gestação de cadelas: revisão de literatura. *Revta Bras. Reprod. Anim*, 36, 158-162.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>

Ferreira, r. f., cerqueira, a. d. m., pereira, a. m., velho, p. b., azevedo, r. r., rodrigues, i. l., & almosny, n. r. (2008). Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(1), 5-8.

Ferroglio, E., Battisti, E., Zanet, S., Bolla, C., Concialdi, E., Trisciuglio, A., ... & Biglino, A. (2018). Epidemiological evaluation of *Leishmania infantum* zoonotic transmission risk in the recently established endemic area of Northwestern Italy. *Zoonoses and public health*, 65(6), 675-682. <https://doi.org/10.1111/zph.12477>

Ferrolho, J., Antunes, S., Vilhena, H., Anastácio, S., Ramalho de Sousa, S., Frouco, G., ... & Domingos, A. (2025). The Complexities of Canine Monocytic Ehrlichiosis: Insights into *Ehrlichia canis* and Its Vector *Rhipicephalus sanguineus*. *Microbiology Research*, 16(4), 85. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16040085>

Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International journal for parasitology*, 35(9), 1031-1035. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.018>

Gary, A. T., Richmond, H. L., Tasker, S., Hackett, T. B., & Lappin, M. R. (2006). Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidate *Mycoplasma haemominutum*' in blood of cats used for transfusions. *Journal of feline medicine and surgery*, 8(5), 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2006.04.005>

Gaunt, S. D., Beall, M. J., Stillman, B. A., Lorentzen, L., Diniz, P. P. V. P., Chandrashekar, R.,

& Breitschwerdt, E. B. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & vectors*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-33>

Ghazisaeedi, F., Atyabi, N., Salehi, T. Z., Tabatabaei, S., Tamai, I. A., Memarian, I., & Tasker, S. (2017). Detection and molecular characterization of feline hemoplasmas in wild felid species in Iran in the Middle East. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 54, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.07.004>

Gondard, M., Cabezas-Cruz, A., Charles, R. A., Vayssier-Taussat, M., Albina, E., & Moutailler, S. (2017). Ticks and tick-borne pathogens of the Caribbean: Current understanding and future directions for more comprehensive surveillance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 490. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00490>

Groves, M. G., Dennis, G. L., Amyx, H. L., & Huxsoll, D. L. (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American journal of veterinary research*, 36(7), 937-940

Guglielmone, A. A., Beati, L., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Nava, S., Venzal, J. M., ... & Estrada-Peña, A. (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in south america. *Experimental & applied acarology*, 40(2), 83-100. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>

Hall, T.A. BioEdit: Um editor de alinhamento de sequência biológica fácil de usar e programa de análise para Windows 95/98/NT. 1999, 41, 95–98. Disponível online: https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT (acessado em 15 de julho de 2025).

Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>

Harvey, J. W., Simpson, C. F., & Gaskin, J. M. (1978). Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *Journal of infectious diseases*, 137(2), 182-188. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182>

Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061.

Irwin, P. J. (2002). Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International journal for parasitology*, 32(5), 581-593. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00361-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00361-7)

Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & vectors*, 2(Suppl 1), S4. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>

Jain, N. C. (1993). Essentials of veterinary hematology.

Jasik, K. P., Okła, H., Słodki, J., Rozwadowska, B., Słodki, A., & Rupik, W. (2015). Congenital tick borne diseases: is this an alternative route of transmission of tick-borne pathogens in mammals?. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(11), 637-644. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1815>

Javeed, N. N., Shultz, L., Barnum, S., Foley, J. E., Hodzic, E., Pascoe, E. L., ... & Dear, J. D. (2022). Prevalence and geographic distribution of *Babesia* conradae and detection of

Babesiavogeli in free-ranging California coyotes (*Canis latrans*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 19, 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.11.004>

Jia, Z., Zhang, Y., Zhao, D., Wang, H., Yu, M., Liu, Z., ... & Wang, X. (2025). Research progress on diagnostic techniques for different *Babesia* species in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1575227. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1575227>

Johnson, C. A. (2008). Pregnancy management in the bitch. *Theriogenology*, 70(9), 1412-1417. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.009>

Jones, E. O., Gruntmeir, J. M., Hamer, S. A., & Little, S. E. (2017). Temperate and tropical lineages of brown dog ticks in North America. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 7, 58-61. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.01.002>

Kawahara, M., et al. (2009). Ehrlichia chaffeensis infection of sika deer, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 15(12): 1991. <https://doi.org/10.3201/eid1512.081667>

Kawahara, M., Tajima, T., Torii, H., Yabutani, M., Ishii, J., Harasawa, M., ... & Rikihisa, Y. (2009). Ehrlichia chaffeensis infection of sika deer, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 1991.

Kidd, L. (2019). Optimal vector-borne disease screening in dogs using both serology-based and polymerase chain reaction-based diagnostic panels. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49(4), 703-718. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.011>

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.

Kockaya, M. (2019). Comparisons of some blood hematological levels and biochemical parameters in pregnant and non-pregnant Kangal shepherd dogs. *Int J Vet Sci Anim Husb*, 4, 5-8.

Kowalewski, M. P., Kazemian, A., Klisch, K., Gysin, T., Tavares Pereira, M., & Gram, A. (2021). Canine endotheliochorial placenta: morpho-functional aspects. In *Placentation in Mammals: Tribute to EC Amoroso's Lifetime Contributions to Viviparity* (pp. 155-179). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77360-1_8

Kumar, A., O'Bryan, J., & Krause, P. J. (2021). The global emergence of human babesiosis. *Pathogens*, 10(11), 1447. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111447>

Labruna, M. B. (2017). Capybaras, ticks, and spotted fever. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 30, 275-277.

Labruna, M. B., & Pereira, M. D. C. (2001). Carrapato em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, 6(30), 24-32.

Labruna, M. B., Gerardi, M., Krawczak, F. S., & Moraes-Filho, J. (2017). Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(1), 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.10.011>

- Laforet, E. G., & Lynch Jr, C. L. (1947). Multiple congenital defects following maternal varicella: report of a case. *New England Journal of medicine*, 236(15), 534-537.
- Lainson, R., & Rangel, E. F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 811-827. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>
- Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y., Peters, J., ... & Lindblad-Toh, K. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8878-8883.
- Lashnits, E. The association of host and vector characteristics with *Ctenocephalides felis* pathogen and endosymbiont infection. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2023.1137059
- Lashnits, E., Grant, S., Thomas, B., Quorollo, B., & Breitschwerdt, E. B. (2019). Evidence for vertical transmission of *Mycoplasma haemocanis*.
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., de Caprariis, D., Cantacessi, C., Capelli, G., Lia, R. P., ... & Otranto, D. (2016). Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasites & vectors*, 9(1), 269.
- Lewis jr, g. e. (1977). the effect of serum and macrophages derived from ehrlichia canis immune dogs on the in vitro growth and development of ehrlichia canis. university of illinois at urbana-champaign.
- Liempi, A., Castillo, C., Medina, L., Galanti, N., Maya, J. D., Parraguez, V. H., & Kemmerling, U. (2020). Comparative ex vivo infection with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* of human, canine and ovine placenta: Analysis of tissue damage and infection efficiency. *Parasitology International*, 76, 102065. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102065>
- Lombardi, M. C., Colácio, N., e Bastos, C. D. V., Coelho, S. G., Moreira, T. F., Meneses, R. M., ... & Silveira, J. A. G. (2025). First molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and hemotropic *Mycoplasma* spp. in bovine colostrum. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 16(6), 102553. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2025.102553>
- Lopes, J. V., Michalsky, É. M., Pereira, N. C. L., Paula, A. J. V. D., Souza, A. G. M., Pinheiro, L. C., ... & Dias, E. S. (2020). Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200141.
- Madewell, B. R., & Gribble, D. H. (1982). Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *Journal of the American veterinary medical association*, 180(5), 512-514.
- Marcondes, M., & Rossi, C. N. (2013). Leishmaniose visceral no Brasil.
- Massung, R. F., et al. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36(4): 1090–1095. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1090-1095.1998>
- Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B., &

Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 1090-1095.

Matei, I. A., D'Amico, G., Yao, P. K., Ionică, A. M., Kanyari, P. W., Daskalaki, A. A., ... & Mihalca, A. D. (2016). Molecular detection of *Anaplasma platys* infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. *Parasites & Vectors*, 9(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1443-3>

Matjila, P. T., Penzhorn, B. L., Bekker, C. P. J., Nijhof, A. M., & Jongejan, F. (2004). Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Veterinary parasitology*, 122(2), 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.019>

Mehrotra, S., Tiwari, R., Kumar, R., & Sundar, S. (2025). Advances and Challenges in the Diagnosis of Leishmaniasis. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 29(2), 195-212. <https://doi.org/10.1007/s40291-024-00762-6>

Metcalf, E. S. (2001). The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Animal reproduction science*, 68(3-4), 229-237. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00159-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00159-2)

Millán, J., Martín-Maldonado, B., Rodríguez-Pastor, R., Martínez-Padilla, J., & Esperón, F. (2024). High diversity, novel genotypes, and vertical transmission of hemotropic *Mycoplasma* in micromammals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 107, 102151. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102151>

Milman, N., BYG, K. E., & Agger, A. O. (2000). Hemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica: ORIGINAL ARTICLE*, 79(2), 89-98. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0412.2000.079002089.x>

Miró, G., & López-Vélez, R. (2018). Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Veterinary parasitology*, 254, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>

Monteiro, D. C., Sousa, A. Q., Lima, D. M., Fontes, R. M., Praciano, C. C., Frutuoso, M. S., ... & Pompeu, M. M. (2016). *Leishmania infantum* infection in blood donors, northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*, 22(4), 739. <https://doi.org/10.3201/eid2204.150065>

Moraes, P. H. G., Rufino, C. P., Baraúna, A. R. F., Reis, T., Agnol, L. T. D., Meneses, A. M. C., ... & Gonçalves, E. C. (2015). Molecular characterization of *Babesia vogeli* in dogs from Belém, northern Brazil. *Genet Mol Res*, 14(4), 16364-16371. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.

Moraes-Filho, J., Krawczak, F. S., Costa, F. B., Soares, J. F., & Labruna, M. B. (2015). Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS One*, 10(9), e0139386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139386>

Movilla, R., García, C., Siebert, S., & Roura, X. (2016). Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasites & vectors*, 9(1), 421. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1686-z>

Nava, S., Beati, L., Venzal, J. M., Labruna, M. B., Szabó, M. P., Petney, T., ... & Estrada-Peña, A. (2018). *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(6), 1573-1585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>

Nei, M. (1987). *Genética evolutiva molecular*. Imprensa da Universidade de Columbia.

Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 891-899. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-891>

O'dwyer, L. H., Massard, C. L., & de Souza, J. C. P. (2001). Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 94(3), 143-150. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00378-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00378-2)

O'Dwyer, L. H., Moco, T. C., & da Silva, R. J. (2004). Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Parasitology Research*, 92(2), 110-112. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1190-9>

O'Dwyer, L. H. (2011). Brazilian canine hepatozoonosis. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, 20, 181-193. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300002>

O'Dwyer, L. H. (2011). Brazilian canine hepatozoonosis. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, 20, 181-193. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300002>

Oliveira, C. M. D., Rodrigues, M. N., & Miglino, M. A. (2012). Iron transportation across the placenta. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 1115-1120.

Oliveira, C. M. D., Rodrigues, M. N., & Miglino, M. A. (2012). Iron transportation across the placenta. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 1115-1120. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000055>

Oliveira, L. P., Cardozo, G. P., Santos, E. V., Mansur, M. A. B., Donini, I. A. N., Zissou, V. G., ... & Marins, M. (2009). Molecular analysis of the rRNA genes of *Babesia* spp and *Ehrlichia canis* detected in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 238-240. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200006>

Otranto, D., de Caprariis, D., Lia, R. P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G., ... & Stanneck, D. (2010). Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Veterinary parasitology*, 172(3-4), 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.017>

- Palmer, J. P., Gazêta, G., André, M., Coelho, A., Corrêa, L., Damasceno, J., ... & Barbosa, A. (2022). Piroplasm infection in domestic cats in the mountainous region of Rio de Janeiro, Brazil. *Pathogens*, 11(8), 900. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080900>
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., ... & Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1184-1191.
- Paludo, G. R., Friedmann, H., Dell'Porto, A., Macintire, D. K., Whitley, E. M., Boudreaux, M. K., ... & Dykstra, C. C. (2005). Hepatozoon spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. *Parasitology Research*, 97(2), 167-170. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1419-2>
- Paschoal, A.M.O., Massara, R.L., Bailey, L.L., Kendall, W.L., Doherty, P.F., Hirsch, A., Chiarello, A.G., Paglia, A.P. (2016). Use of Atlantic Forest protected areas by free-ranging dogs: estimating abundance and persistence of use. *Ecosphere* 7: e01480.
- Pereira, M. R., de Oliveira Silva, A., Rodrigues, P. H. C., de Oliveira Sales, I., da Silveira, J. A. G., & e Bastos, C. D. V. (2025). First Molecular Evidence of Vertical Transmission of Ehrlichia canis in Naturally Infected Female Dogs in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 110674. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110674>
- Perez, M., Rikihisa, Y., & Wen, B. (1996). Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2133-2139. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2133-2139.1996>
- Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., ... & Tasker, S. (2008). RNase P RNA gene (rnpB) phylogeny of Hemoplasmas and other Mycoplasma species. *Journal of clinical microbiology*, 46(5), 1873-1877. <https://doi.org/10.1128/jcm.01859-07>
- Qurollo, B. A., Riggins, D., Comyn, A., Zewde, M. T., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Development and validation of a sensitive and specific sodB-based quantitative PCR assay for molecular detection of Ehrlichia species. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 4030-4032. <https://doi.org/10.1111/jvim.12442>
- Regendanz, P., & Muniz, J. (1936). O Rhipicephalus sanguineus como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 31, 81-84.
- Ribeiro, J. M., Rodrigues-Alves, M. L., Oliveira, E., Guimarães, P. P., Santi, A. M. M., Teixeira-Carvalho, A., ... & Souza-Fagundes, E. M. (2022). Pamidronate, a promising repositioning drug to treat leishmaniasis, displays antileishmanial and immunomodulatory potential. *International Immunopharmacology*, 110, 108952.
- Ribeiro, V. M., Júnior, D. M. G., Ottino, J., Valle, G. R., de Miranda Estevam, L. G. T., de Carvalho, O. V., & Paz, G. F. (2022). Report of the presence of Leishmania infantum in the milk of a naturally infected female dog in Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 36, 100795. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100795>
- Rodríguez-Alarcón, C. A., Beristain-Ruiz, D. M., Olivares-Muñoz, A., Quezada-Casasola, A., Pérez-Casio, F., Álvarez-Martínez, J. A., ... & Figueroa-Millán, J. V. (2020). Demonstrating the presence of Ehrlichia canis DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical

ehrlichiosis. *Parasites & Vectors*, 13(1), 518. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04363-0>

Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V., Gutiérrez, R., Yasur-Landau, D., & Baneth, G. (2014). Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Veterinary parasitology*, 199(3-4), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>

Rubini, A. S., Paduan, K. D. 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(2), 91-93. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1383-x>

Rueda, J. R., Porto, C. D., Franco, R. P., da Costa, I. B., Bueno, L. M. C., Girio, R. J. S., ... & Repetti, C. S. F. (2024). Mammary neoplasms in female dogs: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Veterinárni medicína*, 69(4), 99. <https://doi.org/10.17221/4/2024-VETMED>

Rufino, C. P., Moraes, P. H. G., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D. C. F., McCulloch, J. A., ... & Goncalves, E. C. (2013). Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(12), 846-850.

Rufino, C. P., Moraes, P. H. G., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D. C. F., McCulloch, J. A., ... & Goncalves, E. C. (2013). Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(12), 846-850. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1303>

Ruiz-Fons, F., Sánchez-Matamoros, A., Gortázar, C., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014). The role of wildlife in bluetongue virus maintenance in Europe: lessons learned after the natural infection in Spain. *Virus Research*, 182, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.031>

Sabatini, G. S., Pinter, A., Nieri-Bastos, F. A., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2010). Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of medical entomology*, 47(5), 913-916. <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.5.913>

Salvagni, C. A., Dagnone, A. S., Gomes, T. S., Mota, J. S., Andrade, G. M., Baldani, C. D., & Machado, R. Z. (2010). Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19, 135-140. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612010000300002>

Samsonova, J. V., Saushkin, N. Y., & Osipov, A. P. (2022). Dried Blood Spots technology for veterinary applications and biological investigations: technical aspects, retrospective analysis, ongoing status and future perspectives. *Veterinary Research Communications*, 46(3), 655-698. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09957-w>

Santos, H. A., Pires, M. S., Vilela, J. A., Santos, T. M., Faccini, J. L., Baldani, C. D., ... & Massard, C. L. (2011). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 23(4), 770-774. <https://doi.org/10.1177/1040638711406974>

Santos, H. A., Thomé, S. M., Baldani, C. D., Silva, C. B., Peixoto, M. P., Pires, M. S., ... & Massard, C. L. (2013). Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & vectors*, 6(1), 348. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-348>

Savolainen, P., Zhang, Y. P., Luo, J., Lundeberg, J., & Leitner, T. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298(5598), 1610-1613. <https://doi.org/10.1126/science.1073906>

Seneviratna, P., Weerasinghe, N., & Ariyadasa, S. (1973). Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.

SERAFIM, E., OLIVEIRA, M. R., dos SANTOS, I. G., NETO, M. B. O., Fernando, V., & LIMA, S. (2020). Análise retrospectiva e prospectiva de casos humanos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil e em uma área endêmica em Pernambuco. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, 17(33). DOI: 10.18677/EnciBio_2020C6

Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in parasitology*, 17(2), 74–80. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(00\)01856-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01856-0)

Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, 160(1-2), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>

Silva-Santos, M., Matos, P. T., Lima, V. F. S., Meira-Santos, P. O., & Rocha, L. B. (2014). Micoplasmose em cães: relato de 4 casos. *Enciclopédia Biosfera*, 10(19), 1298-1306.

Silva-Santos, M., Matos, P. T., Lima, V. F. S., Meira-Santos, P. O., & Rocha, L. B. (2014). Micoplasmose em cães: relato de 4 casos. *Enciclopédia Biosfera*, 10(19), 1298-1306.

Silveira, J. A. G. D., Rabelo, É. M. L., Lima, P. C. S., Chaves, B. N., & Ribeiro, M. F. B. (2014). Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 206-215. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014035>

Silveira, J. A. G., Rabelo, É. M. L., Ribeiro, M. F. B. (2011). Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 177(1–2): 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.044>

Silveira, J. A., Rabelo, É. M., & Ribeiro, M. F. (2011). Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary parasitology*, 177(1-2), 61-66.

Silveira, J. A., Reis, I. A., Estevam, L. G., Pinto, M. C., Zwegarth, E., Passos, L. M., & Paz, G. F. (2017). Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(09), 958-962.

Silveira, J. A., Reis, I. A., Estevam, L. G., Pinto, M. C., Zweygarth, E., Passos, L. M., & Paz, G. F. (2017). Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(09), 958-962. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000900010>

Silveira, J. A., Valente, P. C., Paes, P. R., Vasconcelos, A. V., Silvestre, B. T., & Ribeiro, M. F. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(3), 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.003>

Silveira, J. A., Valente, P. C., Paes, P. R., Vasconcelos, A. V., Silvestre, B. T., & Ribeiro, M. F. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(3), 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.003>

Šlapeta, J., Chandra, S., & Halliday, B. (2021). The “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus linnaei* (). *International journal for parasitology*, 51(6), 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.001>

Šlapeta, J., Halliday, B., Chandra, S., Alanazi, A. D., & Abdel-Shafy, S. (2022). *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(6), 102024. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>

Smith, T. G. (1996). The genus *Hepatozoon* (apicomplexa: adeleina). *The Journal of parasitology*, 565-585. <https://doi.org/10.2307/3283781>

Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary parasitology*, 181(1), 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., & Furlanello, T. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary parasitology*, 157(3-4), 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.024>

Soulsby, E. J. L. (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals* (No. 7th edition, pp. xiii+-809pp).

Souza, S. S. A. L. D., Souza, C. E. D., Rodrigues Neto, E. J., & Prado, A. P. D. (2006). Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, 36, 887-891. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000300024>

Stuen, S., Granquist, E. G., & Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>

Szabó, M. P., Mangold, A. J., João, C. F., Bechara, G. H., & Guglielmo, A. A. (2005). Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus*

tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary parasitology*, 130(1-2), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.008>

Szabó, M. P., Pinter, A., & Labruna, M. B. (2013). Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2013). MEGA. *Molecular biology and evolution*, 6, 2725-2729.

Tasker, S. (2020). Hemotropic mycoplasma. *Clinical Small Animal Internal Medicine*, 927-930.

Tavares Pereira, M., Nowaczyk, R., Payan-Carreira, R., Miranda, S., Aslan, S., Kaya, D., & Kowalewski, M. P. (2021). Selected uterine immune events associated with the establishment of pregnancy in the dog. *Frontiers in veterinary science*, 7, 625921. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.625921>

Trapp, S. M., Messick, J. B., Vidotto, O., Jojima, F. S., & de Moraes, H. S. A. (2006). *Babesiagibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 177-180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>

Trapp, S. M., Messick, J. B., Vidotto, O., Jojima, F. S., & de Moraes, H. S. A. (2006). *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 177-180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>

Tsakmakidis, I., Lefkaditis, M., Zaralis, K., & Arsenos, G. (2024). Alternative hosts of *Leishmania infantum*: a neglected parasite in Europe. *Tropical Animal Health and Production*, 56(4), 128. <https://doi.org/10.1007/s11250-024-03978-0>

Valle, G. R., Ribeiro, V. M., de Abreu Teles, P. P., Ottino, J., Salome, D. M., Melo, M. N., ... & Dantas-Torres, F. (2022). Molecular detection of vector-borne pathogens in semen from dogs in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 36, 100799. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100799>

Vercammen, F., De Deken, R., & Maes, L. (1995). Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using the IFAT. *Parasite (Paris, France)*, 2(4), 407-410.

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.


Wardrop, K. J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., & Lappin, M. R. (2005). Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 135-142. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02672.x>

Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., & Gothe, R. (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 89(3), 241-248.

Zhang, Y., Lv, Y., Zhang, F., Zhang, W., Wang, J., Cui, Y., ... & Ning, C. (2016). Molecular and phylogenetic analysis of *Anaplasma* spp. in sheep and goats from six provinces of China. *Journal of veterinary science*, 17(4), 523-529. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.4.523>

ANEXOS:

ANEXO I – Declaração aprovação em Comitê de Ética no uso de animais (UFMG)

 UFMG	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 206/2024	
Título do projeto: OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE HEMOPATÓGENOS EM CADELAS NATURALMENTE INFECTADAS	
Finalidade: Pesquisa	
Pesquisador responsável: Camila de Valgas e Bastos	
Unidade: Escola de Veterinária	
Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado no dia 10/09/2024. Validade: 10/09/2024 à 09/09/2029 Aprovação será homologada na reunião de 23/09/2024.	
Belo Horizonte, 10/09/2024.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br	

ANEXO I – Termo de uso de banco de amostras

TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO DE BANCO DE AMOSTRAS

Eu, Isabela de Oliveira Sales, ocupante do cargo de docente técnica na instituição CNPJ: 34.620.707/0001-39, fui informada

sobre o projeto de pesquisa intitulado "OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO TRANSPLENTÁRIA DE HEMOPATÓGENOS EM CADELAS NATURALMENTE INFECTADAS", que tem como objetivo identificar, por técnicas moleculares, a ocorrência de transmissão vertical dos principais hemopatógenos que acometem cães e, para tanto, necessita analisar os seguintes materiais: amostras de sangue total / placenta de cadelas e sangue /cordão umbilical de neonatos. Portanto, autorizo a pesquisadora Médica Veterinária, Mariana Rodrigues Pereira (CRMV: 25694), e sua equipe, que assinam abaixo, a ter acesso às amostras coletadas durante os procedimentos de partos de cadelas na instituição para desenvolvimento da citada pesquisa.

Eu, Mariana Rodrigues Pereira, pesquisadora Médica Veterinária, me comprometo a obter aprovação do projeto de pesquisa citado na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG), utilizar as amostras exclusivamente para a execução do presente projeto e não divulgar informações que permitam a identificação dos animais, seus tutores e da instituição a que pertencem as amostras, garantindo o sigilo e a privacidade dos envolvidos.

Belo Horizonte, 07 de maio de 2024.

Isabela de Oliveira Sales
Médica Veterinária
CRMV - MG 24855
Mipa 00094398/2021

Isabela de Oliveira Sales

Assinatura do responsável legal pelo banco de amostras

Mariana Rodrigues Pereira
Assinatura do pesquisador

Assinatura do pesquisador

ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (questionário)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL DE HEMOPATÓGENOS EM CADELAS NATURALMENTE INFECTADAS

Nome do pesquisador principal: Camila de Valgas e Bastos Castro

Universidade Federal de Minas Gerais – Ciaep: 02.044.2019

Objetivo: O presente estudo tem como objetivo principal confirmar a ocorrência de hemopatógenos (patógenos que parasitam o sangue) de cães, cadelas e seus filhotes recém-nascidos, pela transmissão vertical (da cadela para prole). **Procedimentos:** Cadelas e sua prole terão sangue colhido uma única vez (cadelas: 3mL de sangue pela punção venosa; filhotes: gota de sangue coletada da ponta de orelha para impregnar papel filtro). Os materiais serão processados para pesquisa de DNA de hemopatógenos. A coleta será realizada durante a internação para assistência ao parto de cadelas na clínica veterinária. **Potenciais riscos para os animais:** Podem ocorrer desconfortos e riscos decorrentes da contenção manual ou por focinheira do(s) animal(is) e coleta de sangue, gerando estresse e risco de ferimentos. **Cronograma:** A estimativa para o resultado do presente estudo é de 1 (um) ano a partir do início das coletas, que serão iniciadas após a aprovação pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA). **Benefícios:** O diagnóstico de hemopatógenos em animais recém-nascidos pela transmissão vertical pode desencadear ações de melhorias no diagnóstico, tratamento e controle das infecções por estes parasitos beneficiando a medicina veterinária e os pacientes caninos.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) neste estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

A Médica Veterinária responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será Mariana Rodrigues Pereira, inscrita no CRMV-MF sob o n. 25694. Além dela, a equipe da Professora Camila de Valgas e Bastos Castro (EV/UFMG) e da Professora Júlia Angélica Gonçalves da Silveira (EV-UFMG), também se responsabilizarão pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com a Pesquisadora Principal ou com a sua equipe pelos contatos referidos neste documento.

Contato:

Tel de Emergência: Mariana Rodrigues Pereira (31) 99230-7597

Email: mvmarianarodriguespereira@gmail.com

Profª Camila de Valgas e Bastos Castro - camilavetmail@gmail.com (31) 98806-7262

Profª Julia Angélica Gonçalves da Silveira – jangelicags@gmail.com (31) 99932-9236

Endereço: Escola de Veterinária da UFMG - Campus Pampulha da UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - São Luiz, Belo Horizonte - MG, 31270-901

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Responsável: _____

Nome: _____

Documento de Identidade: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Identificação do(s) animal(is)

Nome: _____ Espécie: Canina Raça/idade: _____

Nome: _____ Espécie: Canina Raça/idade: _____

Nome: _____ Espécie: Canina Raça/idade: _____

Nome: _____ Espécie: Canina Raça/idade: _____

Nome: _____ Espécie: Canina Raça/idade: _____

C9 - female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	(1nt) 1(+)	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(-)
C10-female	(+)	(-)	(+)	(-)	(nt)	(nt)	**	**	**	**	**	**	**	**
C11-female	(+)	(-)	(+)	(-)	(nt)	(nt)	2	2(-)	(nt)	(nt)	**	**	**	**
C12-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(-)	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(+)
C13-female	(+)	(+)	(+)	(-)	(nt)	(nt)	1	1(+)	(-)	(-)	2	2(-)	(nt)	(nt)
C14-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(-)	3	2(+) 1(-)	1(nt) 2(-)	1(nt) 2(+)
C15-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C16-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C17-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	1	1(-)	(nt)	(nt)	**	**	**	**
C18-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C19-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C20-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C21-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C22-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	1	1(-)	1(nt)	1(nt)
C23-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C24-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C25-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	2	2(-)	(nt)	(nt)	**	**	**	**

C26-female	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(+)
C27-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	2	2(-)	2(nt)	2(nt)
C28-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C29-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C30-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(-)	**	**	**	**
C31-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C32-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C33-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	2	2(-)	(nt)	(nt)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C34-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	2	1(+) 1(-)	1(nt) 1(-)	1(nt) 1(-)
C35-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	**	**	**	**	2	2(+)	2(-)	1(+) 1(-)
C36-female	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	**	**	**	**	1	1(+)	(-)	(1+)
C37-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C38-female	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	**	**	**	**	2	2(+)	2(-)	1(+) 1(-)
C39-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C40-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C41-female	(+)	(-)	(+)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C42-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	2	2(-)	(nt)	(nt)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)

C43-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C44-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C45-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	**	**	**
C46-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	2(-) 1(+)	2(nt) 1(-)	2(nt) 1(-)
C47-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C48-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C48-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C50-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C51-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**

LEGEND: Myc: *Mycoplasma* sp.; Mhc: *Mycoplasma haemocanis*; Cmh: *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*; nt: Amostras não testadas (testou-se nas PCR's específicas somente os materiais positivos nas PCR's genéricas); ** Ausência desse material no estudo.

TABELA II - Os materiais foram testados por nPCR aninhado direcionado ao gene 16S rRNA para o gênero *Anaplasmae* espécies *A. platys* e *A. phagocytophilum*.

A.

Samples	Whole blood from female dogs			Placentas			Pooled organs from stillborn puppies				Whole blood from live-born puppies			
	<i>Anaplasma</i> sp.	<i>A. platys</i>	<i>A. phago</i>	<i>Anaplasma</i> sp.	<i>A. platys</i>	<i>A. phago</i>	Number	<i>Anaplasma</i> sp.	<i>A. platys</i>	<i>A. phago</i>	Number	<i>Anaplasma</i> sp.	<i>A. platys</i>	<i>A. phago</i>
C1 - female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	1	1(+)	(-)	(-)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C2 - female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	1	1(+)	(-)	(-)	2	2(-)	2(nt)	2(nt)
C3 - female	(+)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C4 - female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	2	2(+)	2 (-)	2 (-)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C5 - female	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C6 - female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C7 - female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C8 - female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C9 - female	(+)	(+)	(-)	(-)	nt	nt	2	2(+)	2(-)	2(-)	2	2(-)	2(nt)	2(nt)

C29-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C30-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	2	2(+)	2(-)	1(-) 1(+)	**	**	**	**
C31-female	(-)	nt	nt	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C32-female	(-)	nt	nt	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C33-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	2	2(+)	2(-)	2(-)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C34-female	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	2	2(-)	2(nt)	2(nt)
C35-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	2	2(-)	2(nt)	2(nt)
C36-female	(+)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	1	1(-)	1(nt)	1(nt)
C37-female	(+)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C38-female	(+)	(+)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	2	2(-)	2(nt)	2(nt)
C39-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C40-female	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C41-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C42-female	(+)	(+)	(-)	(-)	nt	nt	2	2(+)	2(+)	2(-)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C43-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	1(+) 2(-)	3(-)	3(-)
C44-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C45-female	(-)	nt	nt	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	**	**	**
C46-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	3(-)	3(nt)	3(nt)

C47-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C48-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C49-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C50-female	(-)	nt	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**
C51-female	(-)	nt	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	**	**	**	**

LEGEND: *A. phago*: *Anaplasma phagocytophilum*; nt: Amostras não testadas (testou-se nas PCR's específicas somente os materiais positivos nas PCR's genéricas); ** Ausência desse material no estudo.

C38-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	2	2(-)	2(nt)	2(nt)
C39-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C40-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C41-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C42-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	2	2(+)	2(-)	2(-)	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C43-female	(+)	(-)	(-)	(-)	nt	nt	**	**	**	**	3	3(+)	3(-)	3(-)
C44-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C45-female	(-)	nt	nt	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	3	**	**	**
C46-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	3	3(-)	3(nt)	3(nt)
C47-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C48-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C49-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C50-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**
C51-female	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	**	**	**	**	**	**	**	**

LEGEND: Hept: *Hepatozoon spp* nt: Amostras não testadas (testou-se nas PCR's específicas somente os materiais positivos nas PCR's genéricas); ** Ausência desse material no estudo.

