

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**Detecção de hemopatógenos e seus vetores na população de cães no município de  
Itabirito – MG**

Matheus Araújo de Alkmim

**Belo Horizonte – MG  
Escola de Veterinária - UFMG  
2019**

**MATHEUS ARAÚJO DE ALKMIM**

**Deteção de hemopatógenos e seus vetores na população de cães no município de Itabirito – MG**

Dissertação apresentada ao Colegiado 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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Camila de Valgas e Bastos Castro

**Belo Horizonte – MG**

**2019**

A415d Alkmim, Matheus Araújo de, 1989-  
Detecção de hemopatógenos e seus vetores na população de cães no município de Itabirito - MG/Matheus  
Araújo de Alkmim - 2019.

83p.: il.

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

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Cães - Doenças - Teses - 2 - Cães - Doenças - Diagnósticos - Teses - 3 - Parasitologia - Teses -  
4 - Parasito - Teses - 1 - Silveira, Júlia Angélica Gonçalves da - II - Castro, Camila de Valgas e Bastos -  
III - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV - Título.

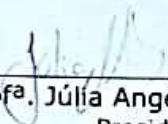
**CDD - 636.089696**

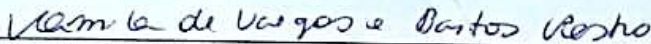
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**MATHEUS ARAÚJO DE ALKMIM**

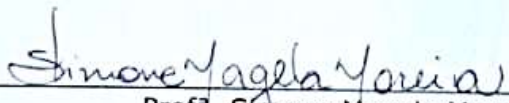
Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA .

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Camila de Vargas e Bastos Castro  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Ricardo Nascimento de Araújo  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Simone Magela Moreira  
Instituto Federal de Minas Gerais - IFMG

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, à minha família, Arthur e Namara, que são minha sustentação, minha fonte de forças e inspiração. Um paradoxal, simplesmente vocês são os amores da minha vida.

Agradeço a meus pais, pela presença amiga e sustentação emocional desde o dia em que nasci. Sem vocês, eu nada seria.

Agradeço a todos os meus irmãos, em especial a Luana pelo companheirismo de longa data e amor eterno.

Agradeço, em especial, a Professora Camila, pela amizade e companheirismo desde os dias iniciais do mestrado. Você é muito especial.

Agradeço a Professora Julia, pelo companheirismo, orientação e por fornecer minha segunda casa dentro da UFMG.

Agradeço ao Professor Eduardo Bastianetto, pela amizade, indicação do local de estudos e bons aconselhamentos durante o período em que aqui estive.

Agradeço ao Professor Romário, por ser meu primeiro orientador e que deu dicas preciosas para a realização deste trabalho.

Agradeço à Professora Kelly, por ter sido minha orientadora por um período do curso.

Agradeço aos Professores Marcelo B. Labruna pela ajuda na identificação de carrapatos e ao Professor Daniel Aguiar pela ajuda com a biologia molecular.

Agradeço aos professores Dr. Ricardo Nascimento Araújo e Dr<sup>a</sup>. Simone Magela Moreira, que aceitaram com muita prontidão e boa vontade em participar da banca,

Agradeço às alunas de iniciação científica (Amanda, Fernanda, Morgana e Anna) pelo companheirismo, amizade e pela ajuda nas coletas e nas análises laboratoriais.

Agradeço, em especial, a Andreina, que me auxiliou em praticamente todas as etapas do projeto, sendo uma grande amiga e companheira de debates, sempre com a frase de impacto: “vai dar tudo certo, jovem!”.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à UFMG pela disponibilidade da estrutura, transporte, funcionários e os materiais necessários para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Agradeço ao DMVP e ao colegiado da Pós-Graduação pelos ensinamentos e por servirem como guia para que este momento fosse possível.

Agradeço a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra tenham contribuído para que fosse possível a minha caminhada até aqui.

Muito obrigado a todos vocês!

## Sumário

Resumo.....	9
Abstract .....	10
1. Introdução geral.....	12
2. Objetivos .....	13
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>13</b>
3. Revisão de literatura.....	14
<b>3.1 Carrapatos de cães no Brasil.....</b>	<b>14</b>
3.1.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato .....	14
3.1.2 Gênero <i>Amblyomma</i> .....	15
3.1.2.1 <i>Amblyomma sculptum</i> .....	15
3.1.2.2 <i>Amblyomma aureolatum</i> .....	16
<b>3.2 Principais agentes da Família Anaplasmataceae transmitidos por carrapatos para cães .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 <i>Ehrlichia canis</i> .....	17
3.2.2 <i>Anaplasma platys</i> .....	23
<b>3.3 Principais hematozoários transmitidos por carrapatos para cães .....</b>	<b>24</b>
3.3.1 <i>Babesia</i> spp. ....	24
3.3.2 <i>Rangelia vitalli</i> .....	30
3.3.3 <i>Hepatozoon canis</i> .....	31
Capítulo 1: CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CARRAPATOS EM CÃES E O PERFIL SANITÁRIO DESSES ANIMAIS NO MUNICÍPIO DE ITABIRITO – REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL. ....	33
Resumo.....	33
<b>Abstract .....</b>	<b>34</b>
1. Introdução .....	35
2. <b>Material e Métodos.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Área de Estudo .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 População em estudo e coletas .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3 Identificação dos Carrapatos .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4 Teste estatístico .....</b>	<b>38</b>
3. Resultados .....	38
4. Discussão.....	42

5. Conclusões .....	45
Capítulo 2: DETECÇÃO DE HEMOPATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS POR MEIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO EM CÃES NO MUNICÍPIO DE ITABIRITO, REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.....	46
Resumo.....	46
Abstract .....	47
1. Introdução .....	47
2. Material e Métodos.....	50
<b>2.1 Área de Estudo .....</b>	<b>50</b>
<b>2.2 População e amostragem do estudo.....</b>	<b>50</b>
<b>2.3 Coletas.....</b>	<b>50</b>
<b>2.4 Análises moleculares.....</b>	<b>51</b>
2.4.1 Extração de DNA .....	51
2.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	51
2.4.3 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento nucleotídico .....	53
<b>2.5 Diagnóstico sorológico .....</b>	<b>53</b>
3. Resultados .....	54
<b>3.1 Análises moleculares.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2 Diagnóstico sorológico.....</b>	<b>56</b>
4. Discussão.....	57
5. Conclusões .....	61
6. Considerações finais.....	61
Referências Bibliográficas .....	62
Apêndice I - Questionário aplicado aos tutores de cães no município de Itabirito – MG.....	78
Apêndice II - TCLE .....	79
Apêndice III – Fitas consenso formadas após sequenciamento .....	81
Anexo I - Anuência da Prefeitura Municipal de Itabirito – MG .....	82
Anexo II – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) .....	83

## Lista de Figuras, Gráficos, Tabela e Quadros

### Capítulo 1:

Figura 1: Localização do município de Itabirito no Estado de Minas Gerais.....	35
Figura 2: Área urbana do município de Itabirito e a sua expansão para o meio rural e silvestre.....	35
Figura 3: Mapa representativo da localização dos cães encaminhados para castração no canil municipal.....	36
Figura 4: Bairro Portões.....	36
Figura 5: Quintal de uma residência localizada no bairro Portões.....	36
Figura 6: Área semi-urbanizada no bairro Portões.....	36
Figura 7: Espécies de carrapatos coletadas em cães no município de Itabirito - MG., representadas por espécimes adultos em posição dorsal.....	38
Gráfico 1: Distribuição dos espécimes de carrapatos por ínstares e sexo coletados em cães do município de Itabirito – MG.....	38
Tabela 1: Distribuição do número de cães infestados por ixodídeos distribuídos pelo sexo e pela origem dos cães examinados no município de Itabirito – MG.....	39
Quadro 1: Bases farmacológicas, métodos e critérios para a realização de tratamentos, já utilizados em uma população amostral de cães no município de Itabirito – MG.....	40
Quadro 2: Espécie de carrapato, método de tratamento e sua frequência e quantidade de cães encontrados parasitados, mesmo com o histórico de intervenção para controle de carrapatos.....	40

### Capítulo 2:

Figura 1: Coleta de sangue por venopunção em cães do bairro Portões.....	51
Figura 2: Géis de agarose a 1% corados com GelRed™ demonstrando a amplificação de algumas amostras enviadas para sequenciamento utilizando os iniciadores para espécies granulocíticas e de plaquetas da família Anaplasmataceae (A), Piroplasmas (B) e <i>Hepatozoon</i> spp. (C).....	55
Figura 3: RIFIs utilizando plasma de cão. Reação positiva para inclusões de <i>E. canis</i> .....	57
Gráfico 1: Amostras de cães positivas para hemopatógenos por método molecular no município de Itabirito.....	56
Quadro 1: Iniciadores utilizados para identificação das hemoparasitoses de cães.....	52
Quadro 2: Condições de tempo e temperatura aplicadas para amplificação de DNA dos hemopatógenos em estudo.....	53
Quadro 3: Distribuição do número de amostras amplificadas por PCR ou nPCR.....	55
Quadro 4: Amostras reagentes em RIFI para <i>A. phagocytophilum</i> e <i>E. canis</i> , suas diluições e proveniência das amostras.....	57
Quadro 5: Comparação entre os resultados dos cães utilizando exame sorológico por RIFI de <i>E. canis</i> e nPCR para membros da família Anaplasmataceae que infectam células monocíticas.....	57

## Lista de abreviaturas

µg: Microgramas  
µL: Microlitros  
µm: Micrômetros  
µM: Micromol  
ALT: Alanina aminotransferase  
AST: Aspartato aminotransferase  
BID: *Bis in die* – duas vezes ao dia  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*  
CEUA: Comitê de ética no uso de animais  
DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)  
EG: Anaplasmataceae de células granulocíticas e plaquetas  
ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)  
EM: Anaplasmataceae de monócitos  
EMC: erliquiose monocítica canina  
EUA: Estados Unidos da América  
ICB/ UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
IFI: Imunofluorescência indireta  
mg/kg: Miligramas por kilo  
*n*PCR: Reação em cadeia de polimerase *nested*  
PCR: Reação em cadeia de polimerase  
PEG: Polietilenoglicol  
PMIF: Fator de inibição da agregação plaquetária  
RIFI: Reação de imunofluorescência indireta  
s. l.: Sensu lato  
S.S.: Sensu stricto  
SC: Subcutâneo  
SID: *Semel in die* – uma vez ao dia  
SMF: Sistema mononuclear fagocítico  
TAE: Tris Acetato EDTA  
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido  
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais  
UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso  
Th1: T *helper* 1  
Th2: T *helper* 2  
VG: Volume globular

## Resumo

Algumas hemoparasitoses têm carrapatos como vetores e assumem elevada importância em medicina veterinária, além do potencial zoonótico de algumas dessas doenças. O objetivo deste trabalho foi detectar espécies de carrapatos presentes nos cães do município de Itabirito, Minas Gerais, uma área de transição de mata atlântica e cerrado, correlacionando com dados sanitários destes animais e detectar hemoparasitos em circulação nestes hospedeiros. Foram coletadas amostras de sangue e carrapatos de 100 cães, sendo nove cães domiciliados destinados à esterilização cirúrgica realizada no canil municipal, 20 cães de rua resgatados e encaminhados para o canil e 71 residentes no Bairro Portões – considerada uma região periurbana em contato com ambiente de mata e rural. Foi também realizado questionário com tutores de cães para levantar informações sanitárias de 78 animais. O teste de Qui-quadrado com significância de 5% foi realizado para correlacionar as respostas do questionário com os cães parasitados. As coletas foram realizadas entre os meses de outubro de 2017 a maio de 2018. Para a identificação dos carrapatos coletados, foi utilizado chaves taxonômicas de ixodídeos. Para a detecção de hemopatógenos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* foi realizada análise molecular em todas as amostras de sangue, por meio da reação em cadeia da polimerase nested (nPCR) e para os gêneros *Hepatozoon*, *Babesia* e *Rangelia* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizado sequenciamento nucleotídico para identificação específica dos agentes etiológicos encontrados. Além disso, o diagnóstico de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum* foi realizado por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), não sendo realizado este método para outras espécies de hemopatógenos. Foram coletados 210 espécimes de carrapatos. Destes, foram encontrados, 47 fêmeas, 68 machos, 62 ninfas e três larvas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l; três machos e cinco fêmeas de *Amblyomma aureolatum*; oito ninfas, quatro fêmeas e oito machos de *Amblyomma sculptum*; e duas fêmeas de *Rhipicephalus microplus*. O parasitismo ocorreu em 3/9 (33,33%) dos cães destinados à esterilização cirúrgica, 11/20 (55%) dos cães provenientes de captura – ambos grupos provenientes do canil municipal - e 48/71 (67,60%) dos cães examinados no bairro Portões. Quanto aos dados sanitários de 78 dos cães, foi relatado que 60,26% dos cães passeavam com os tutores, porém somente 6,08% destes sempre utilizavam coleira com guia. Sobre o confinamento destes animais, 43,59% dos cães não possuíam barreiras físicas de contenção e 5,12% viviam em contato com áreas de mata. Quanto ao contato com outros animais, foi possível identificar 75 cães com este perfil, sendo: 29 tinham contato com outros cães; 28 com outros animais domésticos; e 18 com animais domésticos e silvestres. Não houve diferença significativa na prevalência de infestação entre esses grupos de animais. O controle da infestação por carrapatos era realizado em 57 cães, sendo o uso de banhos contendo antiparasitários o método mais comum. Em geral, os tratamentos não seguiam qualquer tipo de acompanhamento veterinário, sendo demonstrado que os cães expostos a tratamentos antiparasitários não diferiram estatisticamente em prevalência de infestação dos não expostos. Na análise molecular houve amplificação em 17/100 das amostras, com o gene alvo 16S rRNA para membros da família Anaplasmataceae com tropismo por granulócitos ou plaquetas (EG); em 9/100 das amostras para o gene de *Piroplasma* SSU rDNA; em 7/100 das amostras para o gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.; em 5/100 das amostras para o gene dsb de *Ehrlichia* spp. e 1/100 amostra amplificou para o gene *msp4* de *A. phagocytophilum*. Considerando os resultados do sequenciamento, foi possível identificar a circulação de *E. canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*. No diagnóstico sorológico utilizando a RIFI, foi possível detectar 19/100 amostras reativas para *E. canis* na diluição 1:40 e 6/100 para *A. phagocytophilum*, sendo: uma amostra na diluição 1:40, duas 1:80, duas 1:160 e uma 1:320. Conclui-se que há a circulação de hemopatógenos transmitidos por carrapatos na população de cães em Itabirito – MG e estes possuem contato com espécies domésticas e silvestres, o que predispõe a população humana ao

contato com carrapatos de ambientes silvestres e possivelmente a hemoparasitoses carreadas por estes ixodídeos. Futuras pesquisas devem ser realizadas para definir com maior precisão a circulação de *Rangelia vitalli* e *A. phagocytophilum*. Além desses patógenos investigados nesta pesquisa, seria importante uma investigação sobre organismos do gênero *Rickettsia*, transmitidos por carrapatos e de grande importância em medicina veterinária e saúde pública.

**Palavras-chave:** Hemopatógenos, caninos, PCR, carrapatos, RIFI.

### Abstract

Some tickborne diseases play an important role in veterinary medicine in addition to the zoonotic potential of some of these diseases. This study aimed to detect the species of ticks present in dogs from Itabirito, Minas Gerais, a transition area of Atlantic forest and cerrado, connecting this with health data of these animals, and detect hemoparasites in these hosts. Blood samples and ticks were collected from 100 dogs. The origin of these animals were 9 domiciliated dogs which were sent to the castration program, 20 stray dogs rescue and sent to the municipal kennel of the county, and 71 domiciliated dogs in Portões, a neighborhood of Itabirito. The samples from these dogs were collected for convenience sampling. Also, were collected some health information about these dogs with a questionnaire direct to their tutors. In order to assess whether there was a statistical association between the data extract from questionnaire and tick infestation the chi-square test was applied with 5% confidence. The study collections were performed between October 2017 and May 2018. For the identification of the collected ticks, taxonomic keys of ixodids were used. For the detection of hemopathogens of the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma*, molecular analysis was performed on all blood samples, using the nested polymerase chain reaction (nPCR) and for the genera *Hepatozoon*, *Babesia* and *Rangelia* using the polymerase chain reaction (PCR). Nucleotide sequencing was performed to specifically identify the etiologic agents found. In addition, the diagnosis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* was carried out through the indirect immunofluorescence reaction (RIFI), this method not being used for other species of hemopathogens. Were collected 210 tick specimens. From these, were found: 47 females, 68 males, 62 nymphs and three larvae of the *Rhipicephalus sanguineus* s. l; three males and five females of the *Amblyomma aureolatum*; eight nymphs, four females and eight males of *Amblyomma sculptum*; and two females of *Rhipicephalus microplus*. The parasitism occurred in 3/9 (33.33%) referred for surgical sterilization, 11/20 (55%) dogs from capture – these both group of animals were analysed in municipality kennel - and 48/71 (67.60%) dogs examined in Portões neighborhood. About the 78 dogs health data, it was reported that 60.26% of the dogs walking with the tutors; however only 6.08% of these tutors always use leash and guide. Regarding the confinement of these animals, 43.59% of the dogs do not have any physical block barrier and 5.12% live in contact with forest area. Besides, other data reveal that 75 dogs had contact with others animals, as follow: 29 with others dogs; 28 with others domestic animals; and 18 with domestic and wild animals. There was no statistical significant difference in the prevalence of infestation between these groups of animals. The tick infestation control was performed in 57 dogs, and the most common method used was the bath with antiparasitic products. In general, the treatments of dogs did not follow any veterinary professional instructions and, it has been shown that dogs treated with antiparasitic drugs or other methods for tick control did not differ statistically in infestation prevalence when compared with the group without any treatment. In the molecular analysis 17% of samples were amplified using primers for 16S rRNA belongs to the granulocytic and trombocytic Anaplasmataceae members. For SSU rDNA gene from Piroplasm

9% of samples were amplified; 7% samples were amplified for the 18s rRNA gene for *Hepatozoon* spp.; 5% of samples were amplified for *dsb* gene from *Ehrlichia* spp., and 1% of samples were amplified using *msp4* gene as target for *A. phagocytophilum*. By the serological diagnosis using IFAT were detected 19% reactive samples for *E. canis* in 1:40 dilution and 6% reactive samples for *A. phagocytophilum* in the following dilutions: 1 dog - 1:40; 2 dogs – 1:80; 2 dogs – 1:160; and 1 dog – 1:320. In conclusion, there was the circulation of tickborne diseases in this population of dogs in Itabirito – MG and these dogs have contact with wild and domestic species which predisposes the human population have contact with ticks from wild areas and possible to hemopathogens carried by these ticks. Future studies are need in order to better define the *R. vitalli* and *A. phagocytophilum* circulation. Beyond of these pathogens researched in this work, it will be necessary an investigation about *Rickettsia* genus organisms, because they represent great importance in veterinary medicine and public health.

**Key-Words:** Hemopathogens, dogs, PCR, ticks, IFAT.

## 1. Introdução geral

A relação entre humanos e animais é reconhecida desde tempos primordiais das civilizações humanas, sendo os cães os primeiros animais domesticados, em torno de 15 mil anos atrás, com uma população mundial estimada em 500 milhões de indivíduos. Além disso, nos dias atuais, cães são considerados por muitos tutores como membros da família e possuem relação muito próxima com comunidades humanas (Beck, 2000). No Brasil, a dinâmica populacional de animais de companhia demonstra maior participação dos cães, com um número estimado em 52,2 milhões de indivíduos. Estes dados são relevantes, pois demonstram um estreito vínculo entre a população canina e humana (IBGE, 2015). Porém, tutores de animais de companhia alheios às suas responsabilidades, incorrem na posse irresponsável, o que acarreta negligência na busca por auxílio veterinário e abandono desses indivíduos, por diversas razões. Cães abandonados e/ou livres não possuem controle reprodutivo ou de doenças, o que predispõe a população ao crescimento desordenado, risco dos animais se tornarem reservatórios de inúmeros agentes patogênicos zoonóticos, além do aumento dos acidentes por mordidas e arranhões, permitindo assim a transmissão de zoonoses causadas por vírus, bactérias ou parasitos (Wandeler *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2013; Baquero *et al.*, 2017). Deve-se acrescentar, neste contexto, as espécies de animais silvestres com capacidade de serem reservatórios de zoonoses, uma vez que no Brasil há inúmeras regiões com interface entre o meio ambiente urbano, silvestre e rural, seja pela expansão agropecuária ou processo de urbanização em direção a áreas silvestres (Barbosa *et al.*, 2011).

Em países tropicais, dentre as doenças que acometem cães, as hemoparasitoses são das mais prevalentes, devido à alta densidade dos vetores, nestas regiões. Os cães acometidos por esse grupo de agentes etiológicos podem continuar assintomáticos ou desenvolverem distúrbios graves, com possibilidades de evolução para o óbito (Witter *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2015). Os principais hemopatógenos de cães transmitidos por carrapatos de ocorrência no Brasil são causados por rickettsias das espécies *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* e protozoários das espécies *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* (Alves *et al.*, 2014; Araes-Santos *et al.*, 2015; Malheiros *et al.*, 2016). Porém, outros agentes já foram identificados em cães no Brasil como *Babesia gibsoni* (Trapp *et al.*, 2006a), *Rangelia vitalli* (Soares *et al.*, 2011), *Anaplasma phagocytophilum* (Santos *et al.*, 2013) e *Ehrlichia ewingii* (Oliveira *et al.*, 2009).

No Brasil, os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) são exóticos e chegaram nesta região parasitando cães transportados pelos europeus, adaptando-se ao ambiente urbano brasileiro. Esse carrapato tem como hospedeiro preferencial o cão. Por apresentar boa adaptação ao clima tropical brasileiro e ter hábito nidícola, as populações de *R. sanguineus* s.l. conseguem se perpetuar por várias gerações, mesmo com apenas um cão no ambiente (Labruna e Pereira, 2001; Rodrigues *et al.*, 2008). Carrapatos do gênero *Amblyomma* estão presentes em áreas rurais, ambientes periurbanos e de mata nativa e são autóctones da América, sendo que os cães expostos a estas áreas estão predispostos a infestações por esses carrapatos. Carrapatos deste gênero possuem, em geral, baixa especificidade parasitária, principalmente em suas fases de larva e ninfa. Vale ressaltar a grande importância desses ectoparasitos, já que são transmissores de inúmeros patógenos, além de causarem prejuízos diretos ao parasitarem animais de companhia e produção (Labruna *et al.*, 2001).

O município de Itabirito se localiza na região central do estado de Minas Gerais e apresenta áreas de mata atlântica em transição com o cerrado, além de áreas rurais e urbanas. Esta característica da região permite o estabelecimento de diferentes espécies de ixodídeos, que podem parasitar os cães e transmitir diferentes patógenos a esta população. O comportamento da população humana quanto aos cães também foi levado em conta na escolha da área de

estudo, como demonstrado por um levantamento sobre a população canina de Itabirito conduzida por Bastos (2013), que demonstrou uma taxa de abandono de cães no município de 3,60%, dado que revela uma taxa de renovação na população de cães não domiciliados, que poderão servir como fonte de contaminação e transmissão para doenças infecciosas. Quanto a posse de cães, foi mensurado por Bastos (2013) que 34,63% dos cães domiciliados, saem para passeios sem coleira com supervisão do tutor, 19,92% dos cães domiciliados, saem com o tutor com o auxílio de guia e 3,07% dos cães domiciliados, saem sem o acompanhamento do tutor. Em 6,32% das casas não havia barreira física de contenção doméstica dos cães. Estes dois últimos dados demonstram o possível contato entre cães domiciliados e cães não domiciliados ou entre cães e animais de outras espécies, o que aumenta o potencial de infestação desses cães por carrapatos e, possivelmente, a dispersão de agentes transmitidos por esses ectoparasitos. Considerando, o contato íntimo dos cães com seres humanos da região, levantou-se a possibilidade de haver, dentre os agentes circulantes transmitidos por carrapatos, alguns com potencial zoonótico e outros com potencial de causarem sinais clínicos graves em cães. Portanto, pela importância dos hemopatógenos de cães na saúde animal e humana e pelas características propícias encontradas na região para a proliferação de várias espécies de carrapatos vetores, houve interesse na realização da investigação de carrapatos e hemopatógenos de cães no município de Itabirito.

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro dedicado aos carrapatos encontrados nos cães pesquisados em Itabirito e ao perfil epidemiológico dessa população canina e, o segundo capítulo, à identificação de principais hemopatógenias caninas transmitidas por carrapatos por meio de métodos de diagnóstico moleculares e sorológicos realizada em amostras dos mesmos animais.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi identificar carrapatos e hemoparasitos presentes em cães do município de Itabirito – MG.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Coletar carrapatos em fase parasitária nos cães e classificá-los por chaves taxonômicas;
2. Traçar o perfil epidemiológico dos cães e correlacionar com o parasitismo por carrapatos;
3. Detectar, por análise molecular, a presença de hemopatógenos que acometem a população de cães da microrregião em estudo;
4. Realizar a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para avaliar a presença de imunoglobulina G (IgG), visando à detecção de cães sororeagentes para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1 Carrapatos de cães no Brasil

Os carrapatos apresentam-se como o principal ectoparasito de cães em diversas regiões brasileiras (Ribeiro *et al.*, 1997; González *et al.*, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2009; Heukelbach *et al.*, 2012). Eles são reconhecidos como importantes vetores de patógenos (Aragão, 1953; Aragão e levam a prejuízos diretos aos animais por espoliação, reação alérgica pruriginosa, inflamação, alopecia e toxicose por neurotoxinas salivares encontradas em carrapatos fêmeas, além de criarem porta de entrada para infecções secundárias (Jongejan e Uilenberg, 2005; Edlow e McGillicuddy, 2008). A grande capacidade vetorial desses organismos ocorre devido à sua necessidade biológica por hematofagismo em todas as fases de vida, a facilidade de dispersão no ambiente e sua resistência em fases de vida não parasitária (Walker, 1998; Parola e Raoult, 2001; Massard e Fonseca, 2004). Além de sua importante função vetorial, carrapatos apresentam-se como reservatórios com competência para a transmissão transovariana de diversos agentes como, por exemplo, *Babesia canis* e *Rickettsia rickettsi* (Azad e Beard, 1998; Trapp *et al.*, 2006b).

A distribuição dos carrapatos em cães é dependente de fatores ambientais, principalmente a umidade relativa do ar e a temperatura ambiental, que controlam as fases de vida livre das diferentes espécies e, conseqüentemente, determinam a eficiência de parasitismo em cães. Além do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l., o mais predominante em cães, no Brasil, há relatos de parasitismo por *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma aureolatum*, *A. sculptum*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum* e *A. tigrinum*, todas essas espécies do gênero *Amblyomma* ocorrendo em áreas rurais, de mata ou ambientes periurbanos, com variações entre elas dentro das diferentes regiões do país (Aragão, 1936; Evans *et al.*, 2000; Labruna *et al.*, 2001a; Labruna e Pereira, 2001; Szabó *et al.*, 2001; Dantas-Torres, 2009; Costa-Junior *et al.*, 2012).

##### 3.1.1 *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato

O carrapato *R. sanguineus* s. l. é cosmopolita, possuindo distribuição espacial em diferentes biomas. A sua grande dispersão por diferentes ambientes ocorre devido à sua boa adaptação a ambientes antropizados, permitindo a este ixodídeo sobreviver dentro de casa ou canis, em íntima relação com os cães domésticos. O ambiente relativamente homogêneo, criado por seres humanos, interfere em menor grau no seu ciclo em comparação com a variação de temperatura e umidade que ocorre em áreas naturais como, por exemplo, as condições não favoráveis do inverno. Assim, este carrapato mantém-se viável por estar protegido no interior dos ambientes domésticos (Pegram *et al.*, 1987; Dantas-Torres *et al.*, 2013; Nava *et al.*, 2015; Labruna *et al.*, 2017).

Esta espécie de carrapato é reconhecidamente adaptada ao cão doméstico, sendo este considerado o seu hospedeiro primário em todas as suas fases de vida. Sendo assim, a presença do cão é fundamental para a manutenção deste carrapato nos ambientes domiciliares e peridomiciliares (Labruna e Pereira, 2001). O *R. sanguineus* é altamente adaptado ao cão doméstico provavelmente devido a uma ineficiência imunológica do hospedeiro, causada por substâncias imunodepressoras da saliva do carrapato em parasitismo, levando a uma queda na eficiência dos linfócitos T na regulação da resposta imune (Ferreira e Silva, 1998).

Os relatos de infestação mais comum causada por *R. sanguineus* s.l. ocorrem em ambientes urbanos, pois nestes locais há maior adensamento populacional, com maior grau de urbanização e alta densidade de cães. Esses fatores permitem uma alta eficiência no ciclo deste carrapato. No entanto, em áreas rurais, este ixodídeo pode estar presente infestando cães (Aragão, 1936; Evans *et al.*, 2000; Labruna *et al.*, 2001a; Labruna e Pereira, 2001; Szabó *et al.*, 2001; Dantas-Torres, 2009; Costa-Junior *et al.*, 2012). Discute-se ainda o aumento da dispersão de *R. sanguineus* s.l.

para áreas de latitudes mais elevadas, acarretando em possibilidade de transmissão de novos patógenos para hospedeiros destas áreas (Gray *et al.*, 2009). A importância deste carrapato como transmissor de patógenos para humanos (por exemplo, *Rickettsia conorii*, agente causador da febre botonosa) e cães (por exemplo, *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli*) (Dantas-Torres, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2015), o coloca como um parasito de importância no cenário científico da saúde pública e medicina veterinária. Casos de parasitismo em humanos por *R. sanguineus* s.l., no Brasil, são raros, sendo reportado um caso em Pernambuco e outro em Goiás (Dantas-Torres *et al.*, 2006; Louly *et al.*, 2006). Na região mediterrânea, casos de parasitismo por *R. sanguineus* s.l. em humanos são mais frequentes, sendo reportado áreas de endemidade para a febre botonosa. Outras doenças transmitidas por este carrapato podem possivelmente acometer humanos. Dessa maneira, a transposição dessa espécie de carrapato para homens em áreas onde o parasitismo ocorre exclusivamente em cães, poderia colocar em risco a população humana (Goddard, 1989; Gilot *et al.*, 1990; Arraga-Alvarado *et al.*, 2014). Assim, o controle da infestação em animais de companhia é de suma importância como medida de proteção à saúde humana e para a sanidade animal.

O controle desse parasito deve ser baseado no uso de drogas anticarrapaticidas de longa duração em ambientes peridomésticos e domésticos, com ênfase nos locais de repouso dos cães, não desprezando frestas em paredes, devido ao comportamento geotrópico negativo das fêmeas ingurgitadas dos carrapatos *R. sanguineus* s.l., bem como deve ser realizado um tratamento com drogas adequadas sobre os cães. Paz *et al.* (2008) demonstraram que o tratamento de infestação por *R. sanguineus* s.l. deve associar o teste de sensibilidade de produtos acaricidas com estratégias de aplicação do produto sobre os cães e nos locais onde encontram-se os animais. As drogas que podem ser utilizadas para o tratamento dos cães infestados são o fipronil, com apresentação de aplicação pour on ou pipeta. Os piretroides e o amitraz, podem ser utilizados com o uso de colares, pulverização e pipetas de aplicação cutânea. As isoxazolininas são substâncias administradas por via oral em cães (Estrada-Pena e Ascher, 1999; Jongejan *et al.*, 2016).

### 3.1.2 Gênero *Amblyomma*

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* são considerados um dos principais transmissores de patógenos entre espécies animais como, por exemplo, *R. rickettsi* e *R. vitalli*. O parasitismo por carrapatos do gênero *Amblyomma* estão associados a áreas periurbanas, rurais e silvestres. Os cães quando estão presentes nessas áreas irão atrair estes carrapatos e por eles serão afetados. Porém, a presença do cão não é essencial para a manutenção das populações desses carrapatos. Neste cenário, são importantes as espécies *A. sculptum*, *A. aureolatum* e *A. ovale* (Labruna e Pereira, 2001).

#### 3.1.2.1 *Amblyomma sculptum*

O carrapato *Amblyomma sculptum* é ectoparasito primário de equinos, considerando o cenário dos animais domésticos, de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e antas (*Tapirus terrestris*) no contexto dos animais silvestres, em todas as suas fases parasitárias. A sua menor especificidade parasitária, especialmente em fases jovens, contribui para a maior veiculação e dispersão de agentes entre diferentes hospedeiros de diferentes espécies (Labruna *et al.*, 2004a; Massard e Fonseca, 2004; Soares *et al.*, 2018). Esses carrapatos, além de infestarem mamíferos, podem infestar aves, aumentando sua dispersão e, conseqüentemente, a área de distribuição dos patógenos por eles veiculados (Tolesano-Pascoli *et al.*, 2010; Pascoal *et al.*, 2012; Luz e Faccini *et al.*, 2016).

Na região sudeste, *A. sculptum* é o principal transmissor de *R. rickettsii*, rickettsia de importância em saúde pública e que pode causar doença com sinais clínicos semelhantes aos de outras riquetsioses caninas. Neste contexto, o cão pode servir como transportador de carrapatos infectados para o ambiente doméstico e peridoméstico, bem como podem transmitir a rickettsia em fase transitória de rickettsemia para o carrapato, demonstrando a sua importância em ações de controle da febre maculosa considerando o contato com humanos (Piranda *et al.*, 2003).

A distribuição dos picos de infestação das fases parasitárias de *A. sculptum* na região sudeste do Brasil é bem conhecida. Dessa maneira, encontra-se os picos populacionais de larvas no período de menor luminosidade e chuvas, compreendido entre os meses de abril a julho. Em sucessão, a maioria das ninfas são encontradas nos meses de julho a outubro. No período do ano de maior luminosidade e umidade, são encontradas as maiores quantidades de adultos, principalmente entre os meses de outubro a março. Esta distribuição é associada a efeitos de diapausa nas larvas em períodos de maior luminosidade o que garante que as fêmeas façam a postura de ovos nos períodos do ano de maior umidade, aumentando o sucesso reprodutivo da espécie (Labruna *et al.*, 2003). As medidas de controle dessa espécie de ixodídeo são baseadas em sua distribuição anual e centra as ações em banhos carrapaticidas com produtos a base de piretroides nos equinos, principalmente nos períodos do ano em que predominam as fases jovens, naturalmente mais sensíveis a esta droga antiparasitária (Labruna *et al.*, 2004). Com este programa de controle estratégico, ao colocar o equino na pastagem infestada, é possível retirar um grande número de carrapatos das pastagens, o que possibilita o contato destes com as drogas antiparasitárias, evitando um grande impacto ambiental e o uso excessivo de produtos químicos no ambiente (LEITE *et al.*, 1997).

### 3.1.2.2 *Amblyomma aureolatum*

O *Amblyomma aureolatum* é um carrapato associado a ambientes com alta umidade e temperaturas médias entre 18 °C e 22 °C, condições estas encontradas em áreas de mata atlântica. Além disso, as fases adultas são comumente encontradas parasitando carnívoros silvestres. No entanto, as fases adultas deste carrapato possuem boa adaptação ao cão doméstico. As fases jovens estão associadas à passeriformes e pequenos roedores (Guglielmone *et al.*, 2003; Pinter *et al.*, 2004).

As taxas de infestação encontradas por Pinter *et al.* (2004) em uma área rural do estado de São Paulo, foram em média de 1 a 3 carrapatos na maioria dos meses, sendo considerados baixas quando comparadas com as altas taxas de infestação causadas por *R. sanguineus* s.l., provavelmente por fatores de dispersão ambiental do parasito e não propriamente por uma boa imunidade do cão (Labruna e Pereira, 2001). Neste mesmo estudo, os autores encontraram uma abundância constante das formas adultas em parasitismo nos cães, sem tendência clara de picos populacionais em razão de um período do ano. Sabe-se que na região metropolitana da cidade de São Paulo, *A. aureolatum* participa do ciclo de transmissão de *R. rickettsii*, uma bactéria de alta letalidade, causadora da febre maculosa de maneira significativa na região metropolitana da cidade de São Paulo (Labruna *et al.*, 2011). Com isso, Pinter *et al.* (2004) concluíram que a febre maculosa, nesta região, pode ocorrer sem sazonalidade evidente.

Saraiva *et al.* (2014) demonstraram que o período de transmissão de *R. rickettsii* em um modelo experimental durou cerca de 10 horas para os carrapatos de *A. aureolatum* alimentados pela primeira vez. No entanto, carrapatos já previamente alimentados, foram capazes de transmitir a bactéria por um período mínimo de 10 minutos. A estreita relação entre os cães e humanos, o tropismo evidente da fase adulta de *A. aureolatum* para os cães e a alta eficiência de transmissão transtadial e transovariana da bactéria, sendo de 100% da prole contaminada por várias gerações, nestes carrapatos (Labruna *et al.*, 2011), dificulta as ações de controle da febre maculosa nas regiões endêmicas em que este carrapato participa do ciclo de transmissão, sendo uma espécie

de suma importância em saúde animal e humana e que deve ser melhor entendida pela literatura científica.

### 3.2 Principais agentes da Família Anaplasmataceae transmitidos por carrapatos para cães

A família Anaplasmataceae é pertencente à ordem Rickettsiales e possui os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*, sendo consideradas como  $\alpha$ -proteobactérias (Dumler *et al.*, 2001). Há também os organismos do gênero *Aegyptianella* que infectam eritrócitos de aves e, embora não exista consenso quanto à sua classificação, são relacionados a *Anaplasma marginale* (Rikihisa *et al.*, 2003; Rikihisa e Kreier, 2015; Vanstreels *et al.*, 2018).

São bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, que se desenvolvem no interior das células eucarióticas de seus hospedeiros em vacúolos originários da membrana plasmática da célula parasitada, formando uma estrutura denominada mórula. Para completar seu ciclo biológico, em geral, são necessários um hospedeiro invertebrado e um vertebrado, sendo os hemopatógenos dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* transmitidos por carrapatos ixodídeos e do gênero *Aegyptianella* transmitido por argasídeos. Os organismos do gênero *Neorickettsia* são transmitidos por platelmintos da subclasse Digenea. Bactérias intracelulares do gênero *Wolbachia* não causam infecção conhecida em células de hospedeiros vertebrados, sendo parasitos de insetos, filarídeos e aracnídeos (Dumler *et al.*, 2001; Shoemaker *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2011; Vaughan *et al.*, 2012).

No Brasil, as rickettsias endêmicas da família Anaplasmataceae são *A. platys*, que acometem cães e gatos, *E. canis*, acometendo cães e *A. marginale*, agentes de ruminantes (Oliveira e Mourão *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013; Witter *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2014; Fontalvo *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018). Ainda no Brasil, a espécie *Anaplasma phagocytophilum* foi detectada em cães (Santos *et al.*, 2011, 2013; Oliveira, 2015; Silveira *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2017); equinos (Prado *et al.*, 2018); ruminantes silvestres (Silveira *et al.*, 2012); aves silvestres (Machado *et al.*, 2012); e nos carrapatos *R. sanguineus* e *A. sculptum*. Já *Ehrlichia chaffeensis* foi detectada em cervo do pantanal (Machado *et al.*, 2006; Sacchi *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2014) e em aves silvestres (Machado *et al.*, 2012) e *Ehrlichia ewingii* foi descrita em um cão (Oliveira *et al.*, 2009).

Estudos referentes à epidemiologia de rickettsioses, bem como suas interações com animais e humanos no Brasil, são de suma importância para ações preventivas e de controle. Como demonstrado, os cães apresentam susceptibilidade a vários desses agentes e podem servir como sentinelas para o monitoramento da circulação destes hemopatógenos ou mesmo como reservatórios ao terem contato íntimo com os seres humanos, aumentando o risco da transposição dessas doenças do cão para a população humana.

#### 3.2.1 *Ehrlichia canis*

A primeira descrição de *E. canis* foi publicada por Lestoquard e Donatien em 1935, sendo observado inclusões intracitoplasmáticas em monócitos de cães infestados por *R. sanguineus* na Argélia e foi denominado como *Rickettsia canis*. Seu nome foi alterado para *Ehrlichia canis* em 1945, por Moshkovski (Boal, 1959; McDade, 1990).

No Brasil, o primeiro diagnóstico da doença foi realizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, no ano de 1973 por Costa e colaboradores. Em anos subsequentes, foram relatados casos nos estados do Rio de Janeiro (Carrillo, 1976) e Paraná (Kavinski *et al.*, 1988).

Com novos métodos de diagnóstico e caracterização, como a biologia molecular, estudos recentes permitem melhor compreensão dos fatores envolvidos na erliquiose canina em várias partes do

mundo, sendo possível inclusive identificar casos esporádicos de infecção em humanos pela *E. canis* (Dawson *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1996).

O agente *E. canis* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, pleiomórfica de aproximadamente 0,5 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) quando em forma individual, denominada corpúsculo elementar. Após a infecção das células, esta bactéria irá começar a dividir-se por fissão binária, formando o corpúsculo inicial e ao formar uma colônia dentro de um vacúolo intracelular, apresenta-se como mórula, forma característica de todos os membros da família Anaplasmataceae, que pode medir de 1 a 2  $\mu\text{m}$ . No hospedeiro vertebrado a rickettsia possui tropismo por células da linhagem monocítica (McDade, 1990; Dumler *et al.*, 2001).

A principal forma de transmissão de *E. canis* ocorre pelo carrapato vetor *R. sanguineus* s.l. de forma transtadial. Quando a bactéria alcança o intestino dos carrapatos, há invasão de células epiteliais e hemócitos e, após esse período de replicação inicial, o microrganismo coloniza vários tecidos do carrapato, incluindo as glândulas salivares. Não há evidências por microscopia eletrônica ou imunofluorescência de transmissão transovariana. Também não foi demonstrada a presença desta rickettsia em ovários de fêmeas de carrapatos infectadas (Groves *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 1976; McDade, 1990). Dessa forma, as larvas de *R. sanguineus* s. l. não são vetores importantes. A transmissão intraestadial em carrapatos machos foi demonstrada experimentalmente por Bremer *et al.* (2005), o que aumenta o risco de transmissão de *E. canis* para a população canina, já que os machos permanecem por períodos mais longos no hospedeiro e ainda podem continuar transitando em diferentes indivíduos (Bremer *et al.*, 2005; Stich *et al.*, 2008). O carrapato adquire o patógeno em cães que apresentam rickettsemia, geralmente em fases agudas da infecção (Lewis *et al.*, 1977), mas há poucos estudos sobre esta dinâmica de infecção do carrapato que se alimenta em cães parasitados, não excluindo a possibilidade de infecção em outras fases da doença (Stich *et al.*, 2008). Um estudo demonstrou que o carrapato infectado pode transmitir *E. canis* para um cão susceptível após poucas horas do início da alimentação (Fourie *et al.*, 2013). Porém, pode haver pequenas variações considerando o contexto da infecção no Brasil, já que esta pesquisa foi realizada com *R. sanguineus* de origem europeia e isolados de *E. canis* da África do Sul, que apresentam maior similaridade com isolados da Ásia. Esta rápida transmissão pode ser um problema quando são considerados métodos de controle da erliquiose baseados em acaricidas individuais, pois foi demonstrado por Jongejan *et al.* (2016), que o período de ação desses medicamentos pode ser insuficiente para impedir a transmissão da rickettsia *E. canis*.

A transmissão por transfusões sanguíneas em cães com rickettsemia pode ocorrer (Wardrop *et al.*, 2005) e cães em fase subclínica da doença podem permanecer por anos infectados por *E. canis* servindo de fonte de infecção se não for realizado exames laboratoriais de triagem em cães doadores (Harrus *et al.*, 1998a).

Os cães são considerados o reservatório de *E. canis* por permanecerem infectados por longos períodos, além de serem eficientes na transmissão do patógeno aos carrapatos (Groves *et al.*, 1975).

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença de distribuição mundial e com relatos de ocorrência em praticamente todo o território brasileiro, apresentando caráter endêmico em todas as regiões (Aguiar *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2011; Spolidorio *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015) com exceção do estado do Rio Grande do Sul (Krawczak *et al.*, 2012). Há duas populações de *R. sanguineus* s.l., uma no estado do Rio Grande do Sul (clima temperado) e outra no restante do Brasil (clima tropical). A hipótese atualmente aceita para explicar a não endemicidade da EMC no estado do Rio Grande do Sul é baseada na baixa eficiência do carrapato de clima temperado em transmitir *E. canis* (Aragão; Fonseca, 1961; Szabó *et al.*, 2005; Moraes-Filho *et al.*, 2011, 2015; Krawczak *et al.*, 2012).

É importante ressaltar ainda que *E. canis* pode causar erliquiose em humanos de maneira esporádica (Perez *et al.*, 1996, 2006). No Brasil, há dois relatos do vetor, *R. sanguineus*,

parasitando humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2006; Louly *et al.*, 2006), o que demonstra a possibilidade de ocorrência da erliquiose monocítica em humanos por *E. canis* em nosso país. Os sinais clínicos e alterações hematológicas na EMC são variáveis de acordo com diferentes isolados, podendo causar alterações brandas ou graves (Harrus *et al.*, 1997), além das diferenças imunológicas inerentes aos indivíduos infectados, que apresentarão quadros clínicos da doença com diferentes gravidades, como, por exemplo, é demonstrado pela maior susceptibilidade encontrada em cães da raça pastor alemão (Nyindo *et al.*, 1980). Casos de co-infecção com outros patógenos transmitidos pelo *R. sanguineus* s.l. irão aumentar a gravidade da doença (Gal *et al.*, 2007; Gaunt *et al.*, 2010). As alterações no organismo do animal que irão desencadear a doença, são causadas principalmente por distúrbios imunológicos induzidos pelo agente etiológico (Codner *et al.*, 1985; Harrus *et al.*, 1996, 1999). Harrus *et al.* (1998b) demonstraram que mediadores inflamatórios esplênicos e/ou outras substâncias esplênicas desempenham um papel fundamental na patogênese da doença e que cães esplenectomizados tiveram sinais brandos da EMC em relação a cães que não passaram pelo procedimento de retirada deste órgão.

Em infecções experimentais, pode-se dividir a doença em três fases: aguda, subclínica e crônica, embora em infecções naturais pode haver sobreposição dessas fases (Sykes, 2010). A fase aguda ocorre por volta de oito a vinte dias pós-infecção e é caracterizada por sinais clínicos inespecíficos e variáveis. O agente induz plasmocitose da área cortical e medular do linfonodo e hiperplasia linfocítica das zonas paracorticais, o que gera linfadenomegalia em 40 a 75% dos cães (Mylonakis *et al.*, 2011). A erliquiose canina em sua fase aguda causa uma expressão imunológica inflamatória que leva a uma hepatite, com aumento de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) (Munhoz *et al.*, 2012; Carmo *et al.*, 2015). O sistema de sinalização purinérgico é constituído por nucleosídeos, purinas e enzimas regulatórias e controla a atividade inflamatória em linfócitos e está envolvido na erliquiose canina em sua fase aguda, promovendo um perfil pró-inflamatório em determinada fase da doença com o aumento da enzima adenosina deaminase (Silva *et al.*, 2013). Este perfil de citocinas inflamatórias pode ser o fator preponderante que desencadeia os sinais clínicos como a febre, apatia, emaciação, anorexia, edema e dispneia (Unver *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013). Mucosas pálidas e fraqueza podem ocorrer devido à anemia. Epistaxe, hematoquezia, melena e petéquias, são causados por distúrbios plaquetários e vasculite. Alterações oculares e renais ocorrem por reações de hipersensibilidade que irão gerar os imunocomplexos. As alterações neurológicas são causadas principalmente por alterações na microvascularização das meninges, devido ao tropismo de *E. canis* por esta região e por causa do infiltrado de leucócitos. A tosse e as alterações pulmonares são causadas por infiltrado plasmocitário e linfocítico, além da infecção das células monocíticas em microvascularização de pulmões. Este mecanismo está também associado a esplenomegalia e hepatomegalia. As dermatites são causadas por infecções secundárias devido a imunodepressão (Buoro *et al.*, 1990; Rikihisa, 1991; Almosny e Massard, 2002; Moreira *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2011; Harrus *et al.*, 2012; Harrus 2015). Ainda na fase aguda, a alteração laboratorial mais consistente é a trombocitopenia, causada pelo aumento no sequestro de plaquetas devido a diversos fatores imunológicos, como anticorpos antiplaquetários (Harrus *et al.*, 1996; Harrus *et al.*, 1997; Waner *et al.*, 2000), aumento no consumo das plaquetas devido a fatores inflamatórios do endotélio vascular, aumento do sequestro esplênico de plaquetas, distúrbios que diminuem a vida média das plaquetas, além de ocorrer alteração na adesividade plaquetária e o fator de inibição da migração plaquetária (PMIF), uma proteína liberada que atua inibindo a função normal das plaquetas, principalmente inibindo a formação dos pseudópodes (Kakoma *et al.*, 1978; Abeygunawardena *et al.*, 1990). A presença de plaquetas gigantes indica que há resposta medular na fase aguda da doença (Waner *et al.*, 1995). Estas alterações nos trombócitos em conjunto com a vasculite podem ser os fatores que causam os distúrbios hemorrágicos que ocorrem na EMC (Lakkawar *et al.*, 2003; Mylonakis e Konstantina, 2017). É comum ocorrer anemia arregenerativa

devido a um processo de inflamação que suprime a produção de hemácias na medula óssea, além de auto-anticorpos que se aderem em eritrócitos (Harrus *et al.*, 2012; Mylonakis e Konstantina, 2017). Outro processo envolvido pode estar relacionado com uma diminuição de ferro disponível para as células hematopoiéticas (Mylonakis *et al.*, 2010).

A leucometria pode ser variável, sendo a linfopenia, a eosinopenia e o desvio de neutrófilos à esquerda na contagem diferencial de leucócitos, achados comuns (Almosny e Massard, 2002; Mendonça *et al.*, 2005). Atípicas linfocitárias podem ocorrer devido ao intenso estímulo antigênico. É comum ocorrer monocitose (Almosny e Massard, 2002). Há aumento das proteínas de fase aguda nos primeiros dias pós-infecção. Em cães infectados experimentalmente, ocorreu hipoalbuminemia, que pode ser explicado por diversos fatores como anorexia, perda de albumina por aumento de permeabilidade vascular, nefropatia e queda da síntese de albumina (Munhoz *et al.*, 2012). Os animais que se encontram em fase aguda da doença podem se recuperar espontaneamente, principalmente quando desenvolvem uma resposta imune celular eficiente, que é a indutora de proteção, ou entram na fase subclínica da doença (Sykes, 2010; Mylonakis e Konstantina, 2017).

A fase subclínica é caracterizada por alterações na leucometria e, principalmente, na persistência da trombocitopenia leve a moderada (Mylonakis e Konstantina, 2017). O estímulo constante gerado pelo microrganismo, causa aumento de anticorpos que se mantêm em títulos altos por um longo período de tempo. Essas alterações são as principais nesta fase da doença (Waner *et al.*, 1997). Cães infectados podem permanecer em fase subclínica por anos devido a mudança antigênica das proteínas de superfície como mecanismo de escape do sistema imune (Mavromatis *et al.*, 2006).

Alguns cães desenvolvem a fase crônica da doença, que apresenta sinais clínicos semelhantes ao encontrado na fase aguda, porém de forma mais intensa. É comum os cães apresentarem emaciação, fraqueza, distúrbios hematológicos e mucosas pálidas. Uma característica desta fase é a exaustão da medula óssea com acentuada hipocelularidade do sistema hematopoiético, o que causa uma pancitopenia. Pode ocorrer uma hipergamaglobulinemia associada a uma hipoalbuminemia, havendo a inversão da relação albumina/ globulina. Nesta fase, o prognóstico é considerado grave e essas alterações são consideradas a fase terminal da doença. Os cães podem vir a óbito por infecções secundárias ou por distúrbios hemorrágicos (Buhles *et al.*, 1975; Mylonakis *et al.*, 2004; Harrus e Waner, 2011).

O diagnóstico para a EMC é baseado nos sinais clínicos, histórico, epidemiologia, alterações laboratoriais, testes sorológicos, métodos diretos de visualização do agente em monócitos ou linfócitos, reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento (Mylonakis *et al.*, 2003; Harrus e Waner, 2011). É importante conhecer as fases da doença e a dinâmica de infecção por *E. canis* para escolher o melhor método diagnóstico, associando os achados clínicos e hematológicos (Nakaghi *et al.*, 2008).

Para a detecção das mórulas de *E. canis*, Almosny e Massard (2002) afirmaram que a confecção do esfregaço sanguíneo utilizando a primeira gota da ponta de orelha aumenta a sensibilidade deste teste diagnóstico. Estes autores relatam que na primeira gota há maior concentração de mononucleares o que aumenta as chances de serem encontrados monócitos apresentando mórulas. As inclusões em esfregaço sanguíneo são encontradas em um curto período na fase aguda da EMC e em uma pequena proporção dos monócitos circulantes, dificultando sua detecção, como demonstrado em infecção experimental em dois cães por Moreira *et al.* (2005). Nesta pesquisa, dois cães foram inoculados com um isolado de *E. canis* brasileiro (amostra Jaboticabal) e estes apresentaram apenas uma mórula em sangue periférico no dia 11 e 13 pós-infecção, respectivamente. Mylonakis *et al.* (2003), fizeram a comparação por diferentes técnicas de exame direto para detecção de *E. canis*, utilizando a capa de leucócitos, sangue periférico, citologia de linfonodo e medula óssea. O estudo foi realizado em 50 cães com diagnóstico confirmado de

EMC. Neste trabalho, foi também demonstrado pequenas quantidades de células apresentando mórulas, com uma mediana de duas células parasitadas para todos os testes citados. A sensibilidade do esfregaço de sangue periférico foi a mais baixa, sendo detectado mórulas em monócitos e linfócitos de apenas 8% dos cães, utilizando 500 campos e mil campos, respectivamente. Para estes autores, o método de esfregaço sanguíneo para o diagnóstico de EMC, não é aconselhável nem mesmo na fase aguda da doença. Com o método de capa de leucócitos, foi possível determinar a presença de mórulas em 66% dos cães utilizando-se mil campos. Utilizando o aspirado de medula óssea, foi possível detectar mórulas em 56% dos cães, utilizando-se mil campos. Os aspirados de linfonodos detectaram 34% dos cães parasitados, utilizando mil campos. Quando se comparou animais com linfadenomegalia e aqueles sem esta alteração, o exame de linfonodo apresentou melhor sensibilidade, detectando 74% dos cães com essa alteração e 33% dos cães sem a alteração. Dessa forma, em cães com linfadenopatia, o aspirado de linfonodo apresenta uma melhoria significativa na sensibilidade. O método de citologia da medula óssea demonstrou sensibilidade de 34% em mil campos, demonstrando-se mais sensível ao comparar-se com o de sangue periférico. Para concluir, a desvantagem demonstrada dos métodos citológicos foi o tempo de execução da técnica por animal – aproximadamente 60 minutos em mil campos – e a dificuldade em discriminar outras estruturas parecidas com as mórulas, interferindo na especificidade do teste e a relativa baixa sensibilidade (66%), mesmo no teste de melhor desempenho dentro do estudo. Em outro trabalho, Nakaghi *et al.* (2008), selecionaram 30 cães com sinais clínicos ou alterações hematológicas sugestivas de EMC e comparou-se os testes de diagnóstico nPCR, dot-ELISA, RIFI e esfregaço sanguíneo. Em apenas um único animal foi possível detectar mórulas, demonstrando um limite de detecção muito abaixo da nPCR, que identificou 53,3% de cães positivos.

O teste da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi primeiramente desenvolvido por Ristic *et al.* em 1972, devido a necessidade de um método sorológico para a identificação de cães com EMC, já que os métodos diagnósticos presentes até esse período possuíam limitações quanto à sensibilidade e reprodutibilidade. Neste trabalho, foi possível a detecção de anticorpos entre os dias 11 e 28 pós-infecção, em todos os cães inoculados. Este aumento da titulação foi precedido pelo período de febre nos animais. Devido ao desempenho do teste, os autores afirmaram no estudo que a RIFI poderia ser uma ferramenta importante em levantamentos epidemiológicos de EMC, pois indica exposição ao agente *E. canis*. Uma limitação do teste neste estudo foi a impossibilidade de detecção de anticorpos no cão em fase terminal da EMC, provavelmente devido a uma falta de resposta medular por exaustão e hipoplasia. Outro fator importante a ser considerado é as reações cruzadas com outros agentes do gênero *Ehrlichia*, principalmente *E. ewingii* e *E. chaffeensis*, interferindo na especificidade do teste em áreas em que possa ocorrer a sobreposição desses agentes (Wen *et al.*, 1997; Waner *et al.*, 2001). Nakaghi *et al.* (2008) demonstraram que a RIFI é um método importante em levantamentos epidemiológicos, pois detecta os casos de cães portadores em fase subclínica, expostos e em fase crônica da EMC que, em geral, não apresentam alta rickettsemia e, portanto, não são detectáveis em testes diretos de diagnóstico. Harrus *et al.* (1998 b) fizeram a inoculação de *E. canis* em seis cães e demonstraram que estes animais sem tratamento podem entrar em fase subclínica da doença e mantiveram altos títulos de anticorpos detectáveis na RIFI durante os 36 meses de duração do experimento. É importante ressaltar também que para fins de diagnóstico individual, em regiões endêmicas, é primordial associar os achados da imunofluorescência com outras alterações clínico-laboratoriais, pois cães curados da infecção, podem apresentar títulos de anticorpos por longos períodos de tempo e, neste contexto, não há possibilidade de separar os cães que tiveram contato com o agente e não são portadores daqueles em fase subclínica (Bartsch e Greene, 1996; Harrus *et al.*, 1998a; Almosny e Massard, 2002).

Outros testes sorológicos incluem o ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e o dot-ELISA. Estes testes apresentam as mesmas limitações da RIFI. A vantagem do ELISA é a sua maior especificidade em relação a RIFI, pois não apresenta reação cruzada com outros agentes do gênero *Ehrlichia*. O dot-ELISA tem a vantagem de ser utilizado pelo próprio clínico veterinário, sem a necessidade de um laboratório especializado, porém apresenta a desvantagem de não haver padronização entre os diferentes laboratórios e é um teste qualitativo, portanto não é possível fazer um acompanhamento das titulações ao longo do tempo, importante para definir infecções ativas (Sainz *et al.*, 2015).

A PCR apresenta algumas vantagens em relação aos testes sorológicos, pois é capaz de detectar cães positivos antes da soroconversão e é um teste direto, o que aumenta sua especificidade ao detectar o DNA do agente etiológico e é capaz de detectar cães que apresentam uma infecção ativa o que o define como um excelente teste para fins de diagnóstico individual em cães na fase aguda da EMC (Wen *et al.*, 1997; Harrus e Waner, 2011). O limite de detecção da nPCR é outro fator interessante. Wen *et al.* (1997) conseguiram realizar a amplificação do fragmento de DNA da *E. canis* até mesmo em uma concentração de 0,2 picogramas do referido material genético, demonstrando a sua alta sensibilidade para detectar cães positivos mesmo com baixa rickettsemia. Doyle *et al.* (2005), desenvolveram um método de PCR em tempo real, utilizando iniciadores para o gene *dsb* para detecção de várias espécies do gênero *Ehrlichia*. Ao se testar os diferentes iniciadores para as espécies *E. chaffeensis*, *E. canis* e *E. ewingii*, em nenhum dos controles testados houve reação cruzada entre essas espécies, o que demonstra alta especificidade do teste baseado em quais iniciadores são selecionados para a reação. Porém, as fases em que *E. canis* encontra-se albergada em células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente no baço, não haverá a detecção por PCR deste organismo no sangue. (Wen *et al.*, 1997). Considerando esta patogenia, Harrus *et al.* (1998 b) realizaram a PCR em seis cães experimentalmente infectados com *E. canis*, utilizando como material biológico de diagnóstico o sangue, fragmento do baço e medula óssea. Os resultados encontrados foram: dois cães positivos utilizando o sangue, dois positivos com a medula óssea e quatro cães, dentro do grupo de positivos ao se utilizar o baço. Esse resultado era esperado, uma vez que há uma concentração provável maior de *E. canis* em macrófagos do baço (Harrus *et al.*, 1998 a). Assim, o material biológico de escolha para se aumentar a sensibilidade da PCR no diagnóstico de EMC deve ser proveniente do baço. Uma clara desvantagem da utilização de células deste órgão, é a dificuldade de obtenção do material para análise. Neste quesito, o sangue é o tecido de escolha, principalmente em situações em que as coletas devem ser realizadas em um grande número de animais ou em que os recursos não são apropriados para uma biópsia do baço.

O isolamento do agente é laborioso, apresenta altos custos operacionais e demanda tempo para confirmação do resultado, o que o torna incompatível com a rotina diagnóstica. Por este motivo, a cultura de *E. canis* é utilizada como metodologia de pesquisa (Harrus e Waner, 2011).

Em resumo, é importante conhecer a patogenia associada a *E. canis* para a escolha entre um método direto e indireto. A PCR ou nPCR, por exemplo, são testes de escolha nas fases precoces da doença, devido à detecção precoce de cães portadores da bactéria, mesmo utilizando amostras de sangue. Em cães portadores de *E. canis* em fase subclínica ou crônica, testes sorológicos são interessantes, porém devem ser associados a outros parâmetros clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Devido a estes fatores, há uma discordância entre os métodos diretos e indiretos de diagnóstico para EMC (Harrus *et al.*, 1998 b; Nakaghi *et al.*, 2008). Em levantamentos epidemiológicos com amostragem randomizada, é interessante associar o teste sorológico com o método molecular para que possa cobrir todas as fases da doença, já que o interesse nestes casos é detectar a circulação do agente em uma determinada população.

Atualmente, a droga mais utilizada no tratamento de EMC é a doxiciclina (Petrov *et al.*, 2018), sendo esta a droga de escolha (Eddlestone *et al.*, 2007). Os protocolos de tratamento são variados na literatura e demonstram que não há sucesso terapêutico em muitos casos.

O grupo de Neer *et al.* (2002) apresentaram consenso no tratamento por 28 dias em uma dose de 10 mg/kg sid. Outro protocolo foi proposto por Eddlestone *et al.* (2007) utilizando-se 5 mg/kg bid, por 28 dias, demonstrando eficácia no tratamento. Os dois planos terapêuticos podem ser utilizados, sendo importante manter os dias recomendados de tratamento para evitar falhas terapêuticas (Sainz *et al.*, 2015).

A contagem de plaquetas e a normalização de albumina e gamaglobulinas podem ser utilizadas para determinar o sucesso do tratamento (Petrov *et al.*, 2018), sendo indicado o acompanhamento após quatro a oito semanas e seis a nove meses pós-tratamento, respectivamente (Neer *et al.*, 2002). Em casos de infecções crônicas, quando os cães estão com anemia aplástica acentuada, muitas vezes o tratamento não é eficaz (Mylonakis *et al.*, 2004).

O dipropionato de imidocarb é indicado em casos de coinfeção com Babesia, pois não apresenta eficácia na eliminação da infecção por *E. canis* (Eddlestone *et al.*, 2006). A rifampicina é uma droga promissora como alternativa ao tratamento utilizando doxiciclina (Theodorou *et al.*, 2013). O tratamento de suporte com transfusão sanguínea, glicocorticoides, estimulantes de células hematopoiéticas (filgrastim) e fluidoterapia deve ser avaliado individualmente (Mylonakis e Konstantina, 2017; Palacios *et al.*, 2017).

### 3.2.2 *Anaplasma platys*

O agente *A. platys* foi caracterizado pela primeira vez por Harvey *et al.* (1978). Estes pesquisadores descreveram este patógeno como inclusões basofílicas no interior das plaquetas dos cães acometidos e, por meio de infecção experimental, puderam definir a trombocitopenia cíclica associada com fases intercaladas de parasitemia causados pelo agente. Neste estudo, os cães não apresentaram sinais clínicos.

Esta bactéria é intracelular obrigatória e, atualmente, está incluída na ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, sendo reconhecida como o agente causador da trombocitopenia cíclica infecciosa canina (Dumler *et al.*, 2001; Nakaghi *et al.*, 2008). Possui distribuição mundial, sendo possível haver pequenas variações genotípicas dentro deste grupo de organismos, que possuem tropismo por principalmente por plaquetas (De La Fuente *et al.*, 2006). O vetor associado a este agente é o carrapato *R. sanguineus* s.l. devido a detecção de ácidos nucleicos do patógeno neste carrapato e sua distribuição de infecção coincidente com *E. canis* (Almeida *et al.*, 2012; Latrofa *et al.*, 2014). Entretanto, Simpson *et al.* (1991) não conseguiram realizar a transmissão experimental entre um grupo de cães infectados e não infectados utilizando o *R. sanguineus* s.l. como vetor. Porém, as possíveis diferenças específicas dentro do grupo *R. sanguineus* s.l. e as diferenças genotípicas do *A. platys*, podem ser os fatores ligados a este fato, já que foi demonstrado que carrapatos *R. sanguineus* s.l. podem fazer transmissão transtesticular desta rickettsia (Aktas e Ozubek, 2018). A transmissão no Brasil é associada ao *R. sanguineus* s.l. (Costa-Júnior *et al.*, 2013).

No Brasil, *A. platys* foi identificado em várias regiões como Minas Gerais (Costa-Júnior *et al.*, 2013), Mato Grosso do Sul (Soares, R. *et al.*, 2017) Rio Grande do Sul (Lasta *et al.*, 2009), Paraná (Ribeiro *et al.*, 2017), São Paulo (Santos *et al.*, 2009).

Na fase de infecção aguda ocorre uma parasitemia em trombócitos, visualizadas em esfregações de sangue periférico. Após este período inicial, há uma trombocitopenia, não associada com distúrbios hemorrágicos. Depois desta fase, ocorre uma normalização da contagem plaquetária, após três a quatro dias com o retorno da rickettsemia, só que em menor grau. Este ciclo se repete por volta de duas semanas. Na medula óssea pode haver uma hiperplasia megacariocítica

indicando uma resposta plaquetária regenerativa. A doença clínica em cães geralmente apresenta-se como leve, sendo os quadros de maior gravidade geralmente associados a coinfeções, embora possam causar trombocitopenia transitória e cíclica com aproximadamente duas semanas entre os episódios e anemia, além de outros sinais clínicos comuns às outras hemoparasitoses como anorexia e distúrbios hematológicos. Em algumas regiões do mediterrâneo, são relatados a existência de cepas mais patogênicas (Dumler *et al.*, 2001; Beaufils *et al.*, 2002; Inokuma *et al.*, 2002; Gaunt *et al.*, 2010).

O diagnóstico pode ser baseado em exame microscópico direto pela visualização das mórulas em plaquetas. A vantagem deste método é o seu baixo custo e sua alta especificidade. Porém, nas fases de baixa parasitemia, a sensibilidade torna-se baixa. Métodos moleculares como a nPCR podem ser utilizados, apresentando alta sensibilidade e especificidade, porém podem ser negativos em fases de baixas parasitemias (Ferreira *et al.*, 2007). Dentro dos métodos sorológicos, pode-se utilizar o dot-ELISA desenvolvido para o diagnóstico de *A. phagocytophilum* em cães, uma vez que este teste apresenta reação cruzada entre estes organismos (Lasta *et al.*, 2013) e a RIFI (Witter *et al.*, 2013).

O tratamento com a tetraciclina se demonstrou eficiente para a remissão dos sinais clínicos e alterações hematológicas, porém o cão permaneceu como carreador assintomático. Neste mesmo estudo, ao utilizar a doxiciclina, os sinais hematológicos e clínicos se normalizaram e esta droga foi eficiente para a eliminação do agente na dose de 10 mg/kg sid por 10 dias (Chang *et al.*, 1997). Esta rickettsia pode possuir um potencial zoonótico, sendo demonstrado material genético deste agente em uma médica veterinária em contato com animais na Irlanda, África do Sul e Granada (Maggi *et al.*, 2013) e em duas mulheres na Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014). Assim, mais estudos sobre a infecção em humanos seriam necessários para definir a verdadeira participação deste agente na saúde pública.

### 3.3 Principais hematozoários transmitidos por carrapatos para cães

Os protozoários transmitidos por carrapatos estão incluídos nos gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Rangelia* e *Hepatozoon*. O primeiro possui associação com infecções em uma vasta gama de animais e contém algumas espécies de caráter zoonótico, principalmente em indivíduos imunodeprimidos e esplenectomizados e os outros três reconhecidamente acometem animais domésticos e silvestres (Kjemtrup *et al.*, 2000; Schuster, 2002; Massard e Fonseca, 2004; Heim *et al.*, 2007; Serra-Freire, 2014; Sousa *et al.*, 2017).

No Brasil, os hematozoários já descritos parasitando cães, são: *Hepatozoon canis*, comum em áreas rurais e periurbanas (Demoner *et al.*, 2013), *Babesia vogeli* (também descrita como *B. canis vogeli*), patógeno com ampla distribuição pelo território brasileiro (Dantas-Torres e Figueredo, 2006), *Babesia gibsoni*, descrito no estado do Paraná por técnicas de biologia molecular (Trapp *et al.*, 2006a) e, recentemente confirmado como espécie de hemoprotozoário, *Rangelia vitalli* (Soares *et al.*, 2011).

#### 3.3.1 *Babesia* spp.

A primeira identificação de microrganismos pertencentes ao gênero *Babesia* foi realizada por Babés em 1888 na Romênia. Nesta ocasião, foram encontradas inclusões em eritrócitos de bovinos que apresentavam sinais clínicos como febre e hemoglobinúria e o primeiro nome associado a este microrganismo foi *Haematococcus bovis*. Em 1893, Smith e Kilborne descreveram, na América do Norte, o agente etiológico da “Febre do Texas” constatando que se tratava de um microrganismo semelhante ao encontrado por Babes, denominando-o como *Pyrosoma bigeminum*. Estes pesquisadores definiram, provavelmente pela primeira vez, a

transmissão de patógenos por carrapatos. O pesquisador Starcovicci analisou estes parasitos e reclassificou-os, devido às regras taxonômicas, como *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *B. ovis* (citado por Neitz, 1956; Kjemtrup e Conrad, 2000; O'Dwyer e Massard, 2002a; Uilenberg, 2006).

Organismos do gênero *Babesia* que acometem cães, foram primeiramente identificados na Itália, por Piana e Galli-Valerio (1895) e o primeiro nome dado foi *Pyrosoma bigeminum* (Uilenberg *et al.*, 1989). Esta descrição é provavelmente da atual espécie europeia, *B. canis*, devido sua localização geográfica e provável vetor (Uilenberg, 2006).

Devido às diferenças entre os vetores, distribuição geográfica e patogenicidade, ainda em 1935, Reichenow sugeriu a distinção entre as espécies *B. canis* e *B. major*, a primeira de origem europeia e transmitida pelo carrapato *Dermacentor* e a segunda transmitida por *R. sanguineus*. Porém, em 1937 sugeriu a mudança para *B. vogeli*, por causa do uso anterior de *B. major* como um parasito de bovinos. Devido à incapacidade de separação morfológica entre estes diferentes agentes, *B. canis* permaneceu como uma única espécie de distribuição mundial, sendo considerada como uma grande babesia dos cães e a *B. gibsoni* como uma pequena *Babesia* que acomete cães (Uilenberg *et al.*, 1989; Birkenheuer *et al.*, 2004).

Uilenberg *et al.* (1989) propuseram a separação da espécie *B. canis* em três subespécies, devido às diferenças em proteção imunológica cruzada, vetores, patogenicidade, além de reação cruzada parcial em exame sorológico, entre estes isolados. Dessa maneira, a subespécie de ocorrência na Europa transmitida por carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* e de patogenicidade intermediária foi proposta como *B. canis canis*, a de ocorrência na África, principalmente na África do Sul, transmitida por *Haemaphysalis leachi* – atualmente, *H. elliptica* – citado por (Penzhorn, 2011) e de maior patogenicidade foi proposto como *B. canis rossi* e a que possui distribuição nas Américas, Europa e parte da África, de transmissão pelo *R. sanguineus* e de mais baixa patogenicidade, classificou-se como a subespécie *B. canis vogeli*.

Por meio de análises genéticas e biomoleculares, associados aos trabalhos anteriores, alguns autores consideram as grandes babesias como entidades específicas, dividindo-as em três espécies: *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* (Schetters *et al.*, 1997; Zahler *et al.*, 1998; Carret *et al.*, 1999; Eiras *et al.*, 2008). Com as novas análises filogenéticas baseadas em biologia molecular, novas caracterizações genotípicas referentes às pequenas babesias, permitiu a divisão deste grupo de organismos em novas espécies: *B. gibsoni sensu stricto* (s.s.), *B. conradae*, *B. microti-like*, esta última em discussão, sendo reportada como *Theileria annae* (Zahler *et al.*, 2000; Trapp *et al.*, 2006a; Penzhorn, 2011), porém, devido a distinção filogenética com o gênero *Theileria*, houve a proposta de reclassificação para *B. vulpes* (Baneth *et al.*, 2015).

O gênero *Babesia* está compreendido na ordem Piroplasmorida, subclasse Coccidiasina, Classe Sporozoasida, Sub-filo Apicomplexa e Filo Protozoa (O'Dwyer e Massard, 2002a). Os organismos do gênero *Babesia* diferenciam-se do gênero *Plasmodium* por não formarem pigmentos no interior das hemácias, pelo fato de possuírem um metabolismo que degrada a hemoglobina com maior eficiência, além de serem transmitidos por ixodídeos. A diferenciação do gênero *Babesia* em relação ao gênero *Theileria* se dá pelo fato de que todas as fases do primeiro, no hospedeiro vertebrado, ocorrerem em eritrócitos, além dos organismos desse gênero serem eficientes na transmissão transovariana em carrapatos infectados (Uilenberg, 2006).

A espécie *B. vogeli*, ao exame microscópico de hemácias parasitadas, é caracterizada como uma grande babesia com tamanho médio entre 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ . A pequena babesia mede aproximadamente entre 1,0 e 2,5  $\mu\text{m}$ . Esses hemoparasitos, em esfregaços sanguíneos, possuem morfologia piriformes, geralmente se agrupam em pares, unidas por uma extremidade mais afilada (merozoítos). É possível, também, visualizar em esfregaço, outras formas, apresentando-se como organismos redondos, ovais, alongados ou ameboides, em razão de fases de desenvolvimento diferentes em relação aos merozoítos, tais como trofozoítos, esporozoítos e pré-gametócitos.

Formas extracelulares no plasma podem também ser visualizadas (O'Dwyer e Massard, 2002a; Duarte *et al.*, 2008; Chauvin *et al.*, 2009; Irwin, 2010).

Esporozoítos são as formas infectantes de eritrócitos da *B. vogeli*, sendo essas transmitidas ao cão pela saliva do *R. sanguineus* s.l. infectado. O tempo médio para a ativação dos esporozoítos na glândula salivar do carrapato é de 2 a 3 dias, considerando carrapatos adultos (Mehlhorn e Schein, 1985; Chauvin *et al.*, 2009). Após a invasão dos eritrócitos do cão, começa a fase de esquizogonia com a mudança fenotípica dos trofozoítos para merozoítos. A reprodução na fase intraeritrocítica no hospedeiro vertebrado é assexuada por divisão binária e eritrócitos podem se apresentar parasitados por vários merozoítos. Após este ciclo de reprodução, novos merozoítos emergem das células lisadas e invadem novas hemácias hospedeiras para recomencem um novo ciclo de replicação (Young e Morzaria, 1986; Mehlhorn e Schein, 1993; Chauvin *et al.*, 2009). Alguns merozoítos mudam para uma forma ovoide e desenvolvem-se em gamontes. No caso das grandes babesias canina, este processo pode ocorrer ainda no eritrócito, podendo ocorrer mudança fenotípica até corpos raiados ainda no cão (células com protruções na membrana em um lado e uma “espícula” do lado oposto) (Mehlhorn e Schein, 1985, 1993). No carrapato é onde ocorre a reprodução sexuada no ciclo da *Babesia* spp. Os merozoítos, ao serem ingeridos pelo carrapato, são destruídos no seu intestino. Assim, os gamontes são as formas infectantes que irão invadir as células intestinais do carrapato e rapidamente transformar-se em corpos raiados. A partir desta fase, haverá a fusão destes gametas e surgindo um zigoto, que passará por mudanças até se tornar esporocinetos, que saem das células intestinais e invadem vários tecidos do carrapato via hemolinfa, possuindo a capacidade de também invadirem os ovários e os ovos da fêmea, o que permite a transmissão vertical. Após a invasão das células do carrapato, há mudança desta forma móvel para uma forma polimórfica com cromatina nuclear frouxa e lobulada, iniciando a fase de esporogonia. Nesta fase, haverá o crescimento do parasito e posterior fissão, com produção de inúmeros citômeros, ao qual finalmente, irão produzir mais esporocinetos, que continuarão este processo de invasão de novos tecidos, podendo também, invadir os ovários e a glândula salivar. Quando ocorre a muda ou o repasto sanguíneo, os esporocinetos presentes na glândula salivar, são ativados e começam ciclos de replicação para gerarem novos esporozoítos infectantes, que sairão dos alvéolos glandulares e irão entrar em contato com o novo hospedeiro vertebrado via saliva, recomencando o ciclo (Mehlhorn e Schein, 1985, 1993; Irwin, 2010).

A infecção por *Babesia* spp., depende da disponibilidade dos vetores competentes e da circulação do agente etiológico entre seus hospedeiros, sendo reconhecido a distribuição entre as espécies *B. canis* na Europa, *B. vogeli* em todos os continentes, *B. rossi* na África e *B. gibsoni* s.s. em várias partes do mundo (Uilenberg, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Kada *et al.*, 2017). Embora haja diferenças nas linhagens de *R. sanguineus* s. l. e, possivelmente da competência vetorial nesse grupo de espécies (Moraes-Filho *et al.*, 2011; Nava *et al.*, 2012; Latrofa *et al.*, 2014; Dantas-Torres e Otranto, 2015), *B. vogeli* ocorre em várias regiões, tropicais e subtropicais, ao redor do mundo (Cacciò *et al.*, 2002; Inokuma *et al.*, 2004; Eiras *et al.*, 2008; M'ghirbi e Bouattour, 2008; Beck *et al.*, 2009; Beugnet e Marié, 2009; Adamu *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2014; René-Martellet *et al.*, 2015; Starkey *et al.*, 2016), demonstrando que diferentes linhagens (ou espécies) de carrapatos *R. sanguineus* s.l. podem ser vetores competentes para esta espécie de Babesia, embora estudos que comprovem esta afirmação sejam necessários (René-Martellet *et al.*, 2015). Como a transmissão de *B. vogeli* em carrapatos é transetadial e transovariana, estes podem ser considerados reservatórios juntamente com o cão, que apresenta infecção por longos períodos de tempo, muitas vezes assintomática (Trapp *et al.*, 2006b; Chauvin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). A transmissão transplacentária da *B. vogeli* no cão é provável, mas não há confirmação experimental (Birkenheuer, 2013). Pode ocorrer transmissão de *Babesia* spp por transfusão sanguínea (Dantas-Torres e Figueredo, 2006).

A espécie *B. gibsoni* é reconhecidamente transmitida por *Haemaphysalis bispinosa* (Swaminath e Shortt, 1937) e *Haemaphysalis longicornis* (Hatta *et al.*, 2013). Porém, este hemoparasito ocorre em regiões onde não há estes vetores, como no Brasil, EUA, Europa e América Central (Birkenheuer *et al.*, 2003; Trapp *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2014). Dessa maneira, podem estar envolvidos em sua transmissão outros vetores, como o *R. sanguineus* s.l., embora, haja necessidade de mais estudos para comprovação desta via de transmissão (Dantas-Torres e Figueredo, 2006; Hartelt *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2017). Além disso, evidências epidemiológicas de transmissão direta entre cães por contato com sangue, principalmente com histórico de mordida por outros cães. Esta forma pode ser uma importante via de transmissão em regiões onde não se conhece o vetor do agente (Jefferies *et al.*, 2007; Birkenheuer, 2013). Outras rotas de transmissão possíveis para *B. gibsoni* é via transfusão sanguínea (Stegeman *et al.*, 2003) e transplacentária (Fukumoto *et al.*, 2005).

No Brasil, a babesiose canina é causada principalmente por *B. vogeli* (Passos *et al.*, 2005; Trapp *et al.*, 2006b; Moraes *et al.*, 2015), podendo ser considerada uma doença endêmica de cães em todo país (Dantas-Torres e Figueredo, 2006). *B. gibsoni* não é usualmente relatada no Brasil, sendo diagnosticada por Trapp *et al.* (2006a) por meio de exames morfológicos e moleculares. Estudos no estado de Minas Gerais demonstram que o agente causador de babesiose canina encontrado é a *B. vogeli* tanto em cães de ambiente urbano (Passos *et al.*, 2005), quanto em cães de áreas rurais (Costa-Júnior *et al.*, 2009).

A virulência e os sinais clínicos são variáveis de acordo com a espécie de babesia envolvida na infecção dos animais (Schetters *et al.*, 1997; Carret *et al.*, 1999; Penzhorn, 2011), sendo que a espécie envolvida no Brasil - *B. vogeli* (Passos *et al.*, 2005; Costa-Júnior *et al.*, 2009) é a que apresenta menor virulência em comparação com as demais espécies causadoras de babesiose canina (Uilenberg *et al.*, 1989; Zahler *et al.*, 1998). Fatores individuais como coinfeções, imunodepressão e cães esplenectomizados podem levar esses indivíduos a desenvolverem babesiose com quadro clínico de maior severidade e maiores parasitemias. Assim, fatores como a virulência do agente, o grau de infecção e particularidades do hospedeiro determinarão a grande variação dos sinais clínicos da doença, que pode ser subclínica ou até mesmo levar a morte do hospedeiro em casos de infecções superagudas (Shaw *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Birkenheuer, 2013). O período de incubação médio para a *B. canis* é de 10 a 21 dias e para *B. gibsoni* é de 14 a 28 dias (Shaw *et al.*, 2001). As infecções por *Babesia* spp. costumam ser crônicas e podem durar longos períodos e, em alguns casos, a vida toda do animal. Isso ocorre devido a diversos mecanismos de escape do sistema imune que permitem que o parasito matenha-se em processo de replicação, mesmo considerando o ambiente hostil do hospedeiro (Allred, 2003).

A hemólise é uma alteração comum na babesiose (Birkenheuer, 2013) e são propostos vários mecanismos para explicar esta alteração, que podem variar de acordo com a espécie de babesia. A hemólise intravascular começa no primeiro momento pós infecção devido ao processo de replicação da *Babesia* spp. e por danos diretos causados pelo parasito no processo de invasão celular. Neste período, os cães ficam assintomáticos (Murase *et al.*, 1996; O'Dwyer e Massard, 2002a; Birkenheuer, 2013). Alterações osmóticas em hemácias infectadas podem também estar envolvidas na hemólise (Makinde e Bobade, 1994).

A hemólise extravascular ocorre devido ao sequestro dos eritrócitos pelo sistema mononuclear fagocítico, principalmente no baço e no fígado. A presença de antígenos do parasito na membrana dos eritrócitos infectados e a aderência de antígenos solúveis da babesia à membrana de hemácias não infectadas e plaquetas, além da reação imunológica contra autoantígenos, levam a uma ligação de anticorpos e ativação do sistema complemento contra plaquetas e eritrócitos, levando à hemólise intravascular e/ ou extravascular e trombocitopenia (Shaw *et al.*, 2001; Balch e Mackin, 2007; Birkenheuer, 2013). A destruição de hemácias na infecção por *B. vogeli* é

responsável pela anemia regenerativa, geralmente acompanhada de reticulócitos e hemácias nucleadas quando a infecção passa para uma fase mais crônica de maior resposta medular (O'Dwyer e Massard, 2002a; Carli *et al.*, 2009). A hemólise intravascular é responsável pela hemoglobinemia e hemoglobinúria, encontrada na infecção por *Babesia* spp. (Stockham e Scott, 2008a, b). Como na hemólise extravascular, as células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) fagocitam as hemácias, a hemoglobina entrará no ciclo da bilirrubina e, portanto, não contribui para aumentos na hemoglobina circulante (Balch e Mackin, 2007). Porém, em casos de infecções por *B. canis*, mecanismos imunológicos podem não estar envolvidos na hemólise, fato comum em *B. vogeli* e *B. gibsoni*, provavelmente devido à maior cronicidade envolvida nas patologias causadas por essas duas últimas (Carli *et al.*, 2009).

Solano-Gallego *et al.* (2008) fizeram um estudo comparativo na Itália onde foi possível demonstrar que *B. canis* está associada a anemia não regenerativa e sinais clínicos mais previsíveis, porém *B. vogeli* estava associada a comorbidades e apresentava maior variação dos sinais clínicos com anemia regenerativa e trombocitopenia. Carli *et al.* (2009) demonstraram maior grau de cronicidade em *B. vogeli* e houve associação desta espécie causando sintomatologia quando ocorria comorbidades. Foi também comum anemia regenerativa. Casos de icterícia estão associados à sobrecarga do fígado e maior concentração de bilirrubina (O'Dwyer e Massard, 2002a; Schoeman, 2009).

Na fase aguda da doença, ocorre um desbalanço imunológico e a resposta do tipo celular protetora (Th1) é deslocada para uma resposta imune humoral (Th2), com alta produção de anticorpos, que leva a efeitos sistêmicos como hipergamaglobulinemia, anticorpos autoreativos e a deposição de imunocomplexos que podem se acumular na úvea, rins, articulações e sistema nervoso central (Shaw *et al.*, 2001). Lobetti *et al.* (2002) relataram comprometimento cardíaco, principalmente em casos de babesiose mais severos.

Wang *et al.*, (2018) comentaram que as descrições de doença causada por *B. vogeli* de cães infectados à campo possuem a limitação de possível coinfeções. Com o intuito de acompanharem cães com infecção experimental, estes pesquisadores acompanharam as alterações clínico patológicas nesses animais dividindo-os em três grupos: animais controle negativos, animais esplenectomizados e animais com o baço, sendo os dois últimos grupos infectados com uma cepa chinesa de *B. vogeli*. Foi demonstrado que a doença causada é moderada e há evidências de desenvolvimento de doença subclínica, principalmente nos cães não esplenectomizados. Os cães apresentavam infecção por longo período de tempo. As alterações laboratoriais incluíam trombocitopenia e alterações das enzimas hepáticas, esta pode estar envolvida com hepatite aguda não purulenta. Anemia regenerativa também foi relatada. Alguns dos cães esplenectomizados apresentaram severa anemia e isso pode ter levado a sinais clínicos secundários.

No Rio de Janeiro, pesquisadores já descreviam casos de babesiose como uma infecção branda, relatando uma infecção experimental com sinais clínicos mais intensos apenas em um cão muito jovem. Estes autores relatam casos de alguns cães e um canídeo silvestre apresentando icterícia e hemorragias, porém, considerando a descrição patológica e os sinais clínicos, pode-se tratar de uma doença causada por *R. vitalli* (Paraense e Vianna, 1948).

No Brasil, foi realizada infecção experimental com isolados do estado de Minas Gerais, demonstrando ser de baixa virulência, com a maioria dos cães apresentando infecções subclínicas e provável associação com *B. vogeli*. O animal com sintomatologia apresentou fraqueza, anemia, hemoglobinúria e depressão. A alteração laboratorial mensurada no trabalho foi o volume globular (VG), que após a infecção apresentou-se baixo (Bicalho *et al.*, 2002). Os autores não mensuraram outros parâmetros sanguíneos relacionados à bioquímica sérica e hemograma.

Cães esplenectomizados em infecções experimentais no Brasil e que vieram a óbito, apresentaram leucopenia, devido a neutropenia e linfopenia. Animais que não sucumbiram à infecção

apresentaram neutropenia discreta com linfocitose (Kagiwara e Holzchuh, 1987 apud O'Dwyer e Massard, 2002).

Casos de cães naturalmente infectados, incluíram como sinais clínicos: febre, apatia, anorexia, perda de peso, desidratação, dor abdominal e sensibilidade renal à palpação. As anormalidades laboratoriais foram anemia (64.3% dos animais), redução do volume globular (19.6%), eosinopenia (62.5%), neutrofilia (64.3%) e anisocitose (89.3%), sendo a maior parte dos cães acometidos com idade entre zero e quatro anos (Bastos, *et al.*, 2004). Neste estudo, os autores utilizaram registros de animais com babesiose e não foi relatado possíveis comorbidades que pudessem estar associadas com os sinais clínicos apresentados. Médicos veterinários clínicos em Minas Gerais, respondendo a um questionário, descrevem que os sinais clínicos mais comuns em cães com suspeita de babesiose nesta região, foram: apatia, anemia, febre e inapetência (Guimarães *et al.*, 2002). Neste trabalho, também não é possível inferir se coinfeções com *E. canis* ou *Leishmania infantum*, comuns no Estado de Minas Gerais (Silva *et al.*, 2001; Costa Junior *et al.*, 2007), estavam presentes, o que poderia interferir nos sinais clínicos.

O diagnóstico da babesiose canina irá depender do histórico do animal, por exemplo, quando há exposição a carrapatos, dos sinais clínicos, das alterações laboratoriais e das alterações na bioquímica sérica. A confirmação pode ser realizada por esfregaços de sangue, especialmente de capilar periférico para aumentar a sensibilidade, imprints de órgãos durante necropsia, sorológico e molecular (O'Dwyer e Massard, 2002a; Otranto *et al.*, 2010).

O exame de esfregaço sanguíneo tem indicação de utilização principalmente na fase aguda da doença, pois é o momento onde ocorre a parasitemia da *Babesia* spp. No entanto, este exame apresenta baixa sensibilidade e não há distinção entre as subespécies (Silva *et al.*, 2012; Gottlieb *et al.*, 2016).

O exame sorológico é capaz de demonstrar exposição ao parasito, sendo muito útil em levantamentos epidemiológicos e em cães com baixa parasitemia (Araujo *et al.*, 2015), porém não diferencia exposição de infecção ativa (Wagner *et al.*, 1992; Jojima *et al.*, 2008). Assim, para fins de diagnóstico individual, deve-se evitar a interpretação da sorologia isoladamente, sendo importante reunir uma combinação de elementos (Dantas-Torres e Figueredo, 2006; Otranto *et al.*, 2010). Dentre os exames sorológicos utilizados podem-se destacar a RIFI e o ELISA (O'Dwyer e Massard, 2002a).

A PCR é um exame de alta sensibilidade e especificidade para a detecção de cães com *Babesia* (Martin *et al.*, 2006). Em cães com baixas parasitemias, Inokuma *et al.* (2004) demonstraram que a PCR pode ser uma alternativa para detecção de cães cronicamente infectados por *B. vogeli*.

Fraga *et al.* (2011) sugeriram um estudo demonstrando as alterações no ultrassom de cães com babesiose. Os achados neste método de exame foram, principalmente: esplenomegalia, hepatomegalia e mudança na ecogenecidade dos rins. O eletrocardiograma não é um exame com boa confiabilidade em casos de babesiose. Em infecções com comprometimento cardíaco, o uso da troponina medida no soro dos animais é mais sensível (Lobetti *et al.*, 2002).

A eficiência das drogas antiprotozoais para a eliminação de *Babesia* spp. é variável de acordo com a espécie (Baneth, 2018). O dipropionato de imidocarb na dose de 2,5 mg/kg demonstrou-se como uma droga terapêutica eficiente para melhora clínica (Uilenberg *et al.*, 1981) e eliminação da parasitemia, detectado por PCR em cães infectados com *Babesia* sp. é possível na dose com a aplicação de 6,6 mg/kg com intervalo de duas semanas entre duas aplicações (Birkenheuer *et al.*, 2004). Em áreas endêmicas, alguns clínicos podem dar uma subdose de imidocarb, para não eliminar a infecção por completo e manter um estado de premunição no animal, pois a reinfecção em cães sem o parasito, pode causar sinais clínicos. A desvantagem dessa abordagem é que cães cronicamente infectados com algum desequilíbrio imunológico podem desenvolver babesiose e podem continuar como transmissores do agente. O imidocarb pode causar efeitos colinérgicos e como prevenção pode-se usar uma dose de atropina com 30 minutos de antecedência (Vial e

Gorenflot, 2006; Birkenheuer, 2013). Em cães que apresentem lesões renais, o imidocarb deve ser utilizado com cautela e acompanhamento (Máthé *et al.*, 2007). Uma alternativa ao tratamento com o imidocarb é o diaceturato de diminazeno (5 mg/kg IM) em dose única (Vial e Gorenflot, 2006). Porém, esta droga apresenta alta toxicidade para cães com baixa faixa de segurança em relação a dose terapêutica (Baneth, 2018).

Em casos graves de babesiose, a terapia de suporte deve ser realizada, como por exemplo fluidoterapia e transfusão sanguínea (Mitchell e Kruth, 2010; Birkenheuer, 2013; Baneth, 2018)

### 3.3.2 *Rangelia vitalli*

A descoberta de *R. vitalli* ocorreu em 1908 por Roberto Carini e descrição de Bruno Rangel Pestana, porém foi considerada por outros pesquisadores como o mesmo microrganismo causador de babesiose canina, por muitos anos (França *et al.*, 2014). Após este período de tempo, houve a redescoberta dos aspectos patológicos, sorológicos e morfológicos da doença que, por possuir aspectos únicos como ciclo em células endoteliais e leucócitos, foi considerada como uma possível espécie com necessidade de caracterização molecular (Loretti e Barros, 2005).

Soares *et al.* (2011) relatam que *R. vitalli* pode se elevar a nível de espécie separada de *B. vogeli* por meio de caracterização, por biologia molecular, utilizando sequências de nucleotídeos dos genes 18s RNA e HSP-70. Sendo assim, confirmou-se que *R. vitalli* é o agente etiológico envolvido na rangeliase (popularmente “nambiúvu”; “peste de sangue”) e que o gênero *Rangelia* possui associação taxonômica com o gênero *Babesia* (Silva *et al.*, 2011). O agente causador da rangeliase foi encontrado associado a canídeos silvestres e cães de ambiente periurbanos e rural (Loretti e Barros, 2004; Figuera *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2016a), possuindo relatos, até o momento, no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (França *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2017). Foi confirmado que o vetor é o carrapato *Amblyomma aureolatum* (Soares *et al.*, 2018).

Os sinais clínicos associados a doença são anemia, febre, icterícia, esplenomegalia, linfadenomegalia, hemorragia gastrointestinal, hemorragias na ponta da pua auricular, parte externa da orelha, nariz e cavidade oral (França *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). As alterações hematológicas são referentes a uma anemia hemolítica extravascular regenerativa e a uma trombocitopenia imunomediada, que pode estar associada a casos de diátese hemorrágica. Assim, há uma redução na contagem eritrocítica, na hemoglobina e no hematócrito. No início tem-se uma anemia normocítica normocrômica, devido ao tempo necessário para ocorrer a resposta medular. Anemia macrocítica hipocrômica, anisocitose, policromasia, reticulocitose e metarubricitemia indicam resposta medular (anemia regenerativa). Esferocitose, eritrofagocitose e presença de corpúsculo de Howell-Jolly indicam anemia hemolítica imunomediada (França *et al.*, 2010; França *et al.*, 2014).

As alterações no leucograma são variáveis, podendo apresentar leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda, porém pode ocorrer leucopenia com neutropenia, além de linfocitose e monocitose. Plasma icterico é um achado frequente. Redução da agregação plaquetária e coagulação intravascular disseminada (CID) podem ocorrer. Na medula ocorre aumento da linhagem eritroide (França *et al.*, 2010, 2013). Cães com rangeliase podem ter aumento nas proteínas de fase aguda, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (Paim *et al.*, 2013).

O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos, visualização microscópica de inclusões em eritrócitos, neutrófilos, monócitos e células endoteliais em esfregaço sanguíneo ou fragmentos de tecido em exames histopatológicos (França *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2017), alteração nos exames laboratoriais (França *et al.*, 2013; Paim *et al.*, 2013) e PCR (Paim *et al.*, 2016).

O tratamento com prednisona, doxiciclina e dipropionato de imidocarb foi efetivo em cães naturalmente infectados, embora dependendo do grau de acometimento do cão o prognóstico seja

desfavorável (França *et al.*, 2010). Diaceturato de diminazeno é uma opção de tratamento, mostrando-se eficaz no controle das alterações hematológicas e dos sinais clínicos (França *et al.*, 2013).

Em Minas Gerais, há a possibilidade de subdiagnóstico da rangelirose, visto que o parasito foi detectado em cães (Moreira *et al.*, 2013) e em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Silveira *et al.*, 2016b), bem como é conhecida a presença de *A. aureolatum* em ambientes silvestres, neste estado (Rodrigues *et al.*, 2002) e a semelhança dos sinais clínicos com outras hemoparasitoses (Paim *et al.*, 2016).

### 3.3.3 *Hepatozoon canis*

A hepatozoonose canina é causada por protozoários do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidida, Subordem Adeleina e família Hepatozoidae (O'Dwyer e Massard, 2002b). A espécie *H. canis* é identificada como o agente etiológico da doença em cães no Brasil (Paludo *et al.*, 2003). A transmissão é realizada pela ingestão de oócitos esporulados em carrapatos *R. sanguineus* (Baneth *et al.*, 2007; Giannelli *et al.*, 2013). Considerando as variações dentro do grupo de espécies *R. sanguineus* s.l. e a maior prevalência da doença em áreas rurais, é possível que esta espécie de carrapato não participe na transmissão de *H. canis*, no Brasil. A provável espécie de carrapato com capacidade vetorial é o *A. ovale*, porém não está bem estabelecido a participação epidemiológica desta espécie de carrapato como transmissora da doença no país (O'Dwyer *et al.*, 2001; Forlano *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2011; Demoner *et al.*, 2013).

No carrapato, *H. canis* realiza a fase sexuada do ciclo, onde encontra-se os esporocistos na hemocele do carrapato. O parasito não atinge a glândula salivar do ixodídeo, portanto, sua transmissão ocorre quando há a ingestão do ectoparasito pelo cão, ocorrendo a liberação dos esporozoítos no intestino do hospedeiro vertebrado. Após isso, ocorre a invasão do epitélio intestinal do cão, e por via hematogênica dentro das células do SMF, há a invasão de diversos órgãos linfóides secundários. Nestes locais, são formados os merontes (macromerontes e micromerontes). Os micromerontes invadem neutrófilos e macrófagos e sofrem processo de gametogonia, formando os gamontes. Esta é a forma circulante que poderá infectar o carrapato no momento do repasto sanguíneo. Nos tecidos dos cães formam-se os esquizontes. No carrapato, ocorre a transmissão transtádial (O'Dwyer *et al.*, 2001; Demoner *et al.*, 2013). A predação de hospedeiros paratênicos deve ser pesquisada já que o *Hepatozoon americanum* pode ser transmitido por essa via alternativa (Johnson *et al.*, 2009), bem como a transmissão por pulgas, de comum ocorrência em outras espécies do gênero *Hepatozoon* (Smith, 1996).

Os cães infectados podem ser assintomáticos ou apresentarem sinais clínicos variáveis como febre, letargia, anorexia, anemia, emagrecimento, poliúria, polidipsia, dor, vômitos, diarreia, emaciação, dificuldade em manter-se em estação, tremores musculares e linfadenopatia. A gravidade dos sinais clínicos vai depender do grau de parasitemia e infecção concomitante com outros patógenos, como *Babesia* e *Ehrlichia*, sendo inconsistente a descrição de infecção por *H. canis* como causa primária de doença no cão (Mundim *et al.*, 1992; O'Dwyer *et al.*, 2001; O'Dwyer e Massard, 2002b; Aguiar *et al.*, 2004; Lasta *et al.*, 2009). Lesões teciduais, quando presentes, são encontradas particularmente em tecidos hemolinfáticos, musculatura esquelética, pulmões e rins (Paludo *et al.*, 2003).

As alterações hematológicas observadas por Paludo *et al.* (2003) incluíram anemia normocítica e normocrômica, eosinofilia e basofilia, porém, neste estudo, os cães estavam naturalmente infectados e o diagnóstico foi realizado por meio do esfregaço sanguíneo, dessa forma não se pode excluir coinfeções com outros hemoparasitos comuns em cães (O'Dwyer *et al.*, 2001).

O diagnóstico pode ser realizado por meio da PCR, por esfregaço sanguíneo e capa leucocitária, considerando os sinais clínicos e o histórico dos animais (Otranto *et al.*, 2011) e por exame sorológico pela RIFI (Baneth *et al.*, 1996). No esfregaço sanguíneo é possível visualizar os gamontes parasitando leucócitos circulantes (Mundim *et al.*, 1992).

O tratamento da hepatozoonose tem demonstrado resultados contrastantes quando utilizado o dipropionato de imidocarb isoladamente. Quando esta droga foi associada à tetraciclina ou à doxiciclina, os resultados foram mais satisfatórios (O'Dwyer e Massard, 2002b; Thakur *et al.*, 2018). Tratamentos utilizando somente a doxiciclina demonstraram a sua eficiência em diminuir a parasitemia e recuperar a condição clínica. O uso de anti-inflamatórios é benéfico (Roopali *et al.*, 2017).

## Capítulo 1: CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CARRAPATOS EM CÃES E O PERFIL SANITÁRIO DESSSES ANIMAIS NO MUNICÍPIO DE ITABIRITO – REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.

### Resumo

Carrapatos são ectoparasitos de grande relevância na medicina veterinária, pois podem causar prejuízos diretos aos animais, além de serem importantes vetores de vírus, bactérias e parasitos. A distribuição dos carrapatos em cães é dependente de fatores ambientais, que irão controlar as fases de vida livre e das relações parasito/ hospedeiro. No Brasil, cães podem ser parasitados por inúmeras espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente em áreas rurais ou periurbanas, mas são parasitados principalmente por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Devido à importância médico-veterinária dos ixodídeos e dos patógenos por eles transmitidos, o objetivo deste estudo foi identificar as espécies de carrapatos em fase parasitária em cães da região central do estado de Minas Gerais, município de Itabirito, e avaliar o perfil sanitário dos animais por meio de questionário. Para avaliar a associação entre as variáveis medidas no questionário e o número de cães parasitados, foi utilizado o teste do qui-quadrado com significância de 5%. A pesquisa de carrapatos foi realizada em 100 cães divididos entre errantes provenientes do canil municipal após resgate (n=20), encaminhados por tutores para a castração (n=9) e residentes no bairro Portões, com características mistas entre ambiente periurbano e rural (n=71). As coletas ocorreram entre os meses de outubro de 2017 e maio de 2018, excetuando-se o mês de abril. Foram coletados um total de 210 espécimes de carrapatos das seguintes espécies: 180 *R. sanguineus* s.l. (85,71%); 20 *Amblyomma sculptum* (9,52%); oito *Amblyomma aureolatum* (3,81%) e dois *Rhipicephalus microplus* (0,95%). De acordo com o estágio evolutivo do carrapato a distribuição de *R. sanguineus* s. l. encontrada foi, 47 fêmeas, 68 machos, 62 ninfas e três larvas; de *A. aureolatum* três machos e cinco fêmeas; de *A. sculptum* oito ninfas, quatro fêmeas e oito machos; e *R. microplus* duas fêmeas. O parasitismo ocorreu em três dos nove cães destinados à esterilização cirúrgica (33,33%), 11 dos 20 cães provenientes de captura (55%) e 48 dos 71 cães examinados no bairro Portões (67,60%). A coleta de apenas *R. sanguineus* s.l. foi realizada em 40 cães, sendo 28 com origem no bairro Portões, nove de cães resgatados e três de área urbana (encaminhados para castração). Infestações únicas pelas espécies *A. sculptum*, *A. aureolatum* ou *R. microplus* foram observadas, individualmente, em três cães do bairro Portões. Ao considerar as coinfectações, observou-se: dois cães com *A. aureolatum* e *A. sculptum* (um cão do bairro Portões e outro resgatado de área rural), um cão com *A. aureolatum* e *R. sanguineus* s.l. (bairro Portões) e um com *A. sculptum* e *R. sanguineus* s.l. (bairro Portões). Com a avaliação do questionário foi possível levantar informações de 78 animais. Houve um baixo índice de proprietários que utilizavam coleira e guia nos passeios (6,08%). Grande parte dos cães tinham acesso livre à rua (43,59%) e 5,12% viviam em áreas em contato com a mata. Em relação ao convívio com outros animais, 29 cães tiveram contato com outros cães; 28 somente com animais domésticos; e 18 com animais domésticos e silvestres. O controle da infestação por carrapatos foi realizado em 57 cães (73,07 %), sendo o uso de banhos contendo antiparasitários o método mais comum, utilizado em 31 animais (54,38%). Associações com mais de um produto foram relatadas em 14 cães. Em geral, os tratamentos não seguiam acompanhamento veterinário. Conclui-se que grande parte dos tutores de cães da região em estudo não praticam a posse responsável, além de utilizarem produtos acaricidas sem orientação veterinária, o que pode predispor a seleção de populações de carrapatos multi-resistentes. Foram encontradas várias espécies de carrapatos circulando na população canina da região, em especial *R. sanguineus* s.l. O gênero *Amblyomma*, cujas espécies de carrapatos podem comumente parasitar humanos, estava presente em cães da área periurbana e rural. Atenção especial deve ser dada a cães parasitados por esse gênero,

considerando que esses carrapatos podem ser transportados para o ambiente domiciliar, permitindo a transmissão de patógenos de caráter zoonótico à população humana presente nestes locais.

**Palavras-chaves** *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, canino.

### Abstract

In veterinary medicine, ticks have great relevance, as they may cause direct loss in animals and are important vectors for virus, bacteria, and parasites. The tick distribution in dogs depends on environmental factors, which can control the free living phases of the parasite and from relation between host and parasite. In Brazil, dogs can be parasited for several species of *Amblyomma* genus, mainly in rural or peri-urban areas. Nevertheless, the most important tick found in dogs is *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Due to the medical-veterinary importance of ticks and pathogens transmitted by them, the objective of this study was identify the tick species on parasite phase in dogs from the central region of the Minas Gerais state, Itabirito county and evaluate the health profile of the dogs using questionnaire. The ticks were collected on 100 dogs from different areas: 20 dogs from the municipal kennel, nine dogs from kennel castration campaign, and 71 dogs from Portões neighborhood, which presents mixed characteristics between peri-urban and rural areas. The ticks were collected between October 2017 and May 2018, except the April month. Were collected 210 ticks specimens, distributed on the follow species: 180 *R. sanguineus* s.l. (85.71%); 20 *Amblyomma sculptum* (9.52%); 8 *Amblyomma aureolatum* (3.81%) e 2 *Rhipicephalus microplus* (0.95%). The distribution of evolutive phases was: *R. sanguineus* s.l. (47 females, 68 males, 62 nymphs, and 3 larvae); *A. aureolatum* (3 males; 5 females); *A. sculptum* (8 nymphs, 4 females e 8 males); and *R. microplus* (2 females). The parasitism was detected in three of the nine dogs from castration (33.33%), 11 of the 20 dogs from kennel (55%), and 48 of the 71 dogs from Portões (67.60%). Only *R. sanguineus* s.l. was collected on 40 dogs, being 28 from Portões, nine from kennel rescue dogs and three from urban area. Single specie infestation of *A. sculptum*, *A. aureolatum* or *R. microplus* was collected from three dogs. Co-infestations were observed in two dogs with *A. aureolatum* and *A. sculptum* (one from Portões and another animal rescued from rural area), one dog with *A. aureolatum* and *R. sanguineus* s.l. (from Portões) and another one with *A. sculptum* and *R. sanguineus* s.l. (from Portões). With the evaluation of the questionnaire it was possible to collected health information from 78 animals. Few dog's owners reported using collar or guide in walking with dogs (6.08%). Great part of dogs had free access to the street (43.59%), and 5.12% living in contact with forest áreas. 29 dogs had contact with another dogs; 28 had contact only with domestic animals; and 18 with domestic and wild animals. The infestation tick control was used on 57 dogs (73.07%) at least one time, and the main method used was antiparasitic baths (54.38%). Associations between products were used in 14 dogs. In general, the treatments do not follow any veterinary instructions. In conclusion, most of the dog's owners from the Itabirito include in this study do not practice responsible guarding. Besides, the indiscriminate use of acaricides without veterinary orientation, can lead to a selection of tick populations resistant to many acaricides. Several species of ticks were found circulating in the canine population of the region, especially *R. sanguineus* s.l. The genus *Amblyomma*, whose tick species can commonly parasitize humans, was present in dogs from the peri-urban and rural areas. Special attention should be paid to dogs parasitized by this genus, considering that these ticks can be transported to the home environment, allowing the transmission of zoonotic pathogens to the human population present in these places.

**Keywords:** *Rhipicephalus*; *Amblyomma*; canine.

## 1. Introdução

Os ectoparasitos são organismos de grande relevância pois causam sérios prejuízos à saúde animal de forma direta por lesões espoliativas, que facilitam a entrada de microrganismos oportunistas ou podem levar a paralisia motora flácida ascendente causada por neurotoxinas. De forma indireta, são importantes transmissores de parasitos, vírus e bactérias para animais e seres humanos (González *et al.*, 2004; Edlow e McGillicuddy, 2008; Elsheikha, 2011). Os carrapatos apresentam-se como o principal ectoparasito de cães em diversas regiões brasileiras (Ribeiro *et al.*, 1997; González *et al.*, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2009; Heukelbach *et al.*, 2012). Além disso, desde os primórdios da ixodologia no Brasil, carrapatos são reconhecidos como importantes vetores de patógenos (Aragão, 1936; Aragao e Fonseca, 1953a). A grande capacidade vetorial desses organismos ocorre devido à sua necessidade biológica por hematofagismo em todas as fases de vida, a facilidade de dispersão no ambiente e sua resistência em fases de vida não parasitária (Walker, 1998; Parola e Raoult, 2001; Massard e Fonseca, 2004). Além da função vetorial, carrapatos apresentam-se como reservatórios com competência para a transmissão transovariana de diversos agentes como, por exemplo, *Babesia canis* e *Rickettsia rickettsi* (Azad e Beard, 1998; Trapp e Dagnone *et al.*, 2006).

A distribuição dos carrapatos em cães é dependente de fatores ambientais, principalmente a umidade relativa do ar e a temperatura ambiental, que controlam as fases de vida livre das diferentes espécies e, conseqüentemente, determinam a eficiência de parasitismo. A relação parasito/hospedeiro é outro fator importantes para manter os níveis populacionais dos ixodídeos. Além do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s. l., o mais predominante em cães, no Brasil, há relatos de parasitismo nesta espécie animal por *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma oblongoguttatum* e *Amblyomma tigrinum*, todas essas espécies do gênero *Amblyomma* ocorrendo em áreas rurais, de mata ou ambientes periurbanos, com variações entre elas dentro das diferentes regiões do país (Aragão, 1936; Evans *et al.*, 2000; Labruna *et al.*, 2001a; Labruna e Pereira, 2001; Szabó *et al.*, 2001; Dantas-Torres, 2009; Costa-Junior *et al.*, 2012).

O carrapato *R. sanguineus* s.l. está disperso em várias regiões do mundo, mesmo levando em consideração diferentes biomas. Isso ocorre devido a adaptação desta espécie frente a ambientes antropizados, vivendo dentro de casas ou canis em íntima relação com os cães domésticos. Uma vez que o ambiente, relativamente homogêneo, criado por seres humanos interfere em menor grau no seu ciclo em comparação com a variação ambiental que ocorre na natureza, o *R. sanguineus* s.l mantém-se viável mesmo em condições não favoráveis como no inverno, embora, atualmente, discute-se variações específicas dentro deste grupo (Pegram *et al.*, 1987; Dantas-Torres *et al.*, 2013; Nava *et al.*, 2015; Labruna *et al.*, 2017). A infestação causada por *R. sanguineus* s.l., ocorre normalmente em ambientes urbanos, porém podem ocorrer também em áreas rurais (Aragão, 1936; Evans *et al.*, 2000; Labruna *et al.*, 2001a; Labruna e Pereira, 2001; Szabó *et al.*, 2001; Dantas-Torres, 2009; Costa-Junior *et al.*, 2012). A importância deste carrapato como transmissor de patógenos para seres humanos – por exemplo, *Rickettsia conorii*, e cães – por exemplo, *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli* (Dantas-Torres, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2015), o coloca como um parasito de importância em saúde pública e medicina veterinária.

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* são considerados um dos principais transmissores de patógenos entre espécies animais, já que possuem menor especificidade parasitária, especialmente em fases imaturas (Massard e Fonseca, 2004). Esses carrapatos, além de infestarem mamíferos, podem infestar aves, aumentando sua dispersão e, conseqüentemente, os patógenos por eles veiculados (Tolesano-Pascoli *et al.*, 2010; Pascoal *et al.*, 2012; Luz *et al.*, 2016a).

Em relação ao carrapato de bovinos, *Rhipicephalus microplus*, infestações também podem ocorrer em cães com acesso a áreas de pastagens contaminadas com altas cargas parasitárias (Labruna, *et*

*al.*, 2001; Costa-Junior *et al.*, 2012). Porém, o cão é hospedeiro acidental deste carrapato e não é capaz de ser mantenedor destes parasitos na natureza (Franque *et al.*, 2007).

Devido à importância médico-veterinária dos ixodídeos e dos patógenos por eles transmitidos, alguns potencialmente zoonóticos, o objetivo deste estudo foi identificar as espécies de carrapatos em fase parasitária em cães da região central do estado de Minas Gerais, município de Itabirito. A escolha pela microrregião de Itabirito para a realização do presente estudo se deu devido à presença de condições adequadas para a existência de *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. (ambiente de transição de mata-atlântica com o cerrado brasileiro) e às características mistas entre área urbanizada, rural e silvestre observadas no município. Além disso, avaliou-se o perfil sanitário de cães amostrados, por meio de questionário, a fim de se conhecer os fatores de risco de exposição para a infestação por diferentes espécies de carrapatos.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Área de Estudo

O município de Itabirito localiza-se na latitude 20°15'11''Sul e longitude 43°47'21'' Oeste, na região central do estado de Minas Gerais e pertence à região do “quadrilátero ferrífero”, localizando-se a 55 km da capital, Belo Horizonte (Figura 1). O município ocupa uma área de 541,93 km<sup>2</sup> e possui temperatura média anual de 18,5°C. O clima da região é caracterizado como tropical de altitude, sendo o período seco de junho a agosto e a época de chuvas entre novembro e março. O bioma é caracterizado por mata atlântica em transição com o cerrado brasileiro e possui o relevo do tipo mares de morro. Itabirito faz parte do roteiro turístico mineiro, o que determina uma população flutuante anual, sendo possível que cães de outras regiões se infestem por carrapatos presentes na mata ou em áreas periurbanas. É possível observar propriedades rurais separando os fragmentos de mata nativa do ambiente urbano em expansão no centro (Figura 2) (“Dados geográficos, Prefeitura Municipal de Itabirito”, [s.d.]; Myr projetos sustentáveis, 2013).

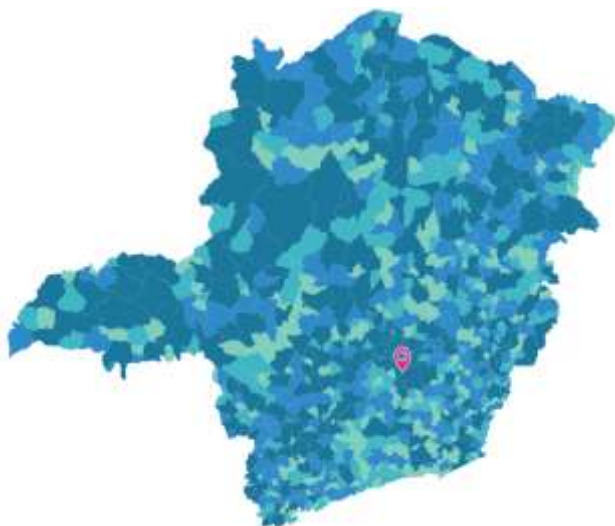


Figura 1 – Localização do município de Itabirito no Estado de Minas Gerais.

Fonte: IBGE (Modificado)



Figura 2 - Área urbana do município de Itabirito e a sua expansão para o meio rural e silvestre.

Observam-se ainda áreas fragmentadas de mata (asteriscos brancos). Fonte: MapBox (modificado)

## 2.2 População em estudo e coletas

Dados sobre a população canina de Itabirito foram levantados por censo conduzido pelo Centro de Controle de Zoonoses, estimando-se o número total de indivíduos em aproximadamente 9.462 cães em 2011 (Bastos, 2013). Como não havia estudos de levantamentos de hemoparasitoses em cães na região, determinou-se uma prevalência padrão de 50%, possibilitando o cálculo do tamanho da amostra pelo software Epi Info versão 7.2.1.0 na aba “population survey”, com uma margem de erro aceitável de 10% (Naing *et al.*, 2006). Em um intervalo de confiança de 95%, foi determinado uma amostra aleatória mínima de 95 cães.

Foi realizada a coleta de carrapatos em 100 cães, sendo nove oriundos da esterilização cirúrgica, realizada pela prefeitura do município (representados por símbolos azuis em áreas urbanizadas na figura 3), 20 resgatados de diversas áreas do município e encaminhados para o canil municipal e 71 residentes no bairro Portões (residências representadas por estrelas azuis na figura 4). Observa-se que o bairro Portões dispõe áreas periurbanas e rurais, representadas nos locais de coletas visualizados nas figuras 5 e 6.



Figura 3 – Mapa representativo da localização dos cães encaminhados para castração no canil municipal. Os pontos estão marcados com o símbolo azul com uma bandeira branca no centro. Na parte superior à direita está representado a entrada do bairro Portões. Fonte: Google Maps (Modificado).

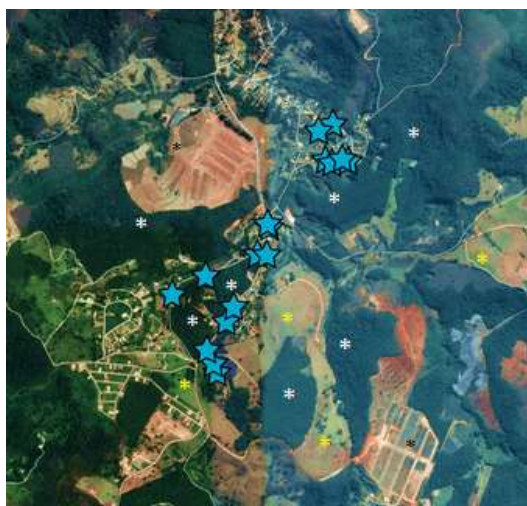


Figura 4 - Bairro Portões. Os locais de visita estão marcados com estrelas azuis, áreas de construção de condomínios com asteriscos pretos; pastagens com asteriscos amarelos e matas com asteriscos brancos. Fonte: Google Maps (Modificado).



Figura 5 – Quintal de uma residência localizada em área rural no bairro Portões. É possível observar que há locais com mata em volta das residências. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 6 – Área peri-urbana no bairro Portões. Ao fundo é possível visualizar área de pastagem e abertura de condomínio. Fonte: Arquivo Pessoal.

As coletas foram realizadas entre os meses de outubro de 2017 e maio de 2018, excetuando-se o mês de abril. Dos animais amostrados, todos foram classificados quanto ao sexo e tutores de 78 cães responderam um questionário semiestruturado (Apêndice I) após concordarem com a participação de seus animais no estudo (Apêndice II). A partir das respostas, foram obtidos dados relacionados ao controle parasitário e a frequência de uso de carrapaticidas, ambiente em que os animais viviam, acesso a matas ou pastagens e contato com outros animais.

Os carrapatos foram coletados no lado esquerdo do corpo do animal por catação manual, após inspeção visual e tátil (modificado de Silveira *et al.*, 2009). Não houve o interesse em quantificar os carrapatos por cão, assim a finalidade do uso desta metodologia de coleta era realizar uma amostragem de carrapatos por animal, a fim de caracterizar as espécies presentes nos cães. Os exemplares foram acondicionados em frascos individualmente identificados com o número do animal contendo etanol 70%.

Este estudo foi realizado com a anuência da Prefeitura Municipal de Itabirito (Anexo I) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o registro 290/2017 (Anexo II).

### 2.3 Identificação dos Carrapatos

A identificação dos carrapatos foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico kenavision 3310, por chaves taxonômicas de ixodídeos propostas por Aragão e Fonseca (1961a) para ixodídeos adultos e Martins *et al.* (2010) para ninfas de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Para a classificação de larvas e ninfas de *R. sanguineus* s.l. comparou-se com a morfologia proposta por Pegram *et al.* (1987).

### 2.4 Teste estatístico

Foi utilizado, por meio do *software* bioestat 5.3, o teste do qui-quadrado com grau de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) a fim de observar diferença estatística entre presença ou ausência de carrapatos nesses cães em relação ao sexo, histórico de exposição a tratamentos carrapaticidas e acesso a rua.

## 3. Resultados

Foram coletados um total de 210 espécimes de carrapatos, distribuídos entre 180 de *R. sanguineus* s.l. (85,71%); 20 de *A. sculptum* (9,52%); oito de *A. aureolatum* (3,81%) e dois de *R. microplus* (0,95%). Quanto à distribuição entre os sexos e as fases dos carrapatos *R. sanguineus* s. l., foram encontradas, 47 fêmeas, 68 machos, 62 ninfas e três larvas; de *A. aureolatum* três machos e cinco fêmeas; de *A. sculptum* oito ninfas, quatro fêmeas e oito machos; e de *R. microplus* duas fêmeas (Gráfico 1). A figura 7 ilustra exemplos de carrapatos coletados em cães neste estudo, sendo: um macho (A) e uma fêmea (B) de *R. sanguineus* s.l., um macho (C) e uma fêmea (D) de *A. aureolatum*, uma fêmea (E) e um macho (F) de *A. sculptum* e uma fêmea de *R. microplus* (G).

Sobre a espécie de carrapato predominante, *R. sanguineus* s. l., uma das larvas foi coletada em um cão no mês de janeiro e outras duas em um único cão no mês de fevereiro. As ninfas deste carrapato foram coletadas em todos os meses de coleta, exceto maio. As formas adultas foram encontradas em todas as coletas. Sobre o *A. sculptum*, todas as ninfas foram coletadas no mês de novembro em um único cão. Já as fases adultas deste carrapato foram coletadas em quatro cães diferentes, sendo em um cão no mês de novembro e, em outros três cães, em março. Os carrapatos *A. aureolatum* foram encontrados nos meses de novembro, dezembro e março, sendo todos na forma adulta. Os exemplares de *R. microplus* foram coletados em um único cão no mês de março.

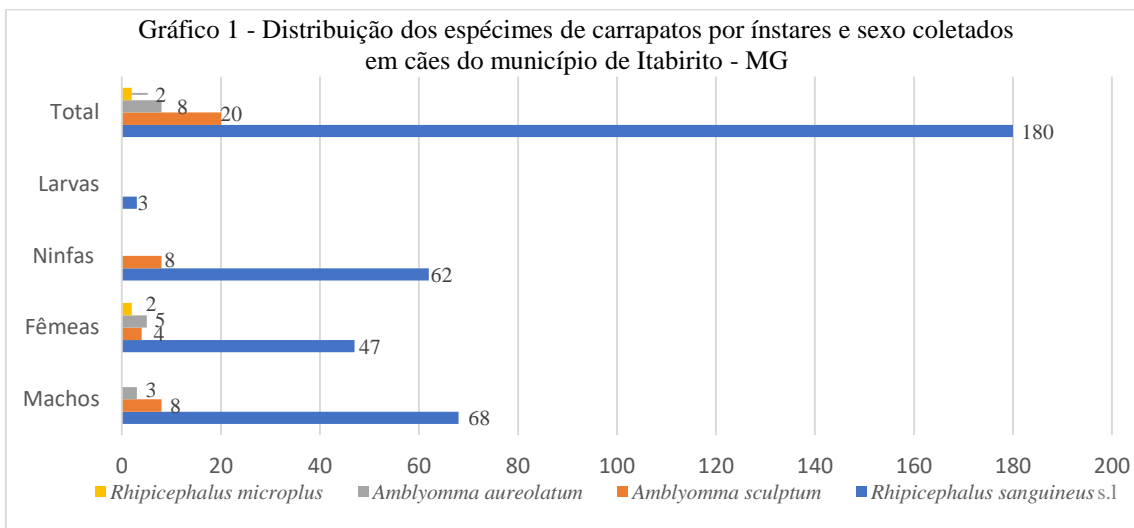


Figura 7 - Espécies de carrapatos coletadas em cães no município de Itabirito - MG., representadas por espécimes adultos em posição dorsal. A: *R. sanguineus s.l.* (Macho); B: *R. sanguineus s.l.* (Fêmea); C: *A. aureolatum* (Macho). D: *A. aureolatum* (Fêmea); E: *A. sculptum* (Fêmea); F: *A. sculptum* (Macho); G: *R. microplus* (Fêmea). Fonte: Arquivo pessoal.

Dos 100 cães examinados, 52 eram fêmeas e 48 eram machos. Dentre as cadelas, 48,07% (25/52) apresentaram carrapatos e, em relação aos cães machos, 47,91% (23/48) estavam infestados, sem diferença estatística de parasitismo entre sexos ( $p=0,8538$ ).

Dentre os nove animais encaminhados à esterilização cirúrgica, todos provenientes de áreas urbanas, três estavam infestados por carrapatos (33,33%). Dos 20 cães provenientes de captura, 18 não tinham dados quanto a localização da origem e dois eram de áreas rurais. A presença de carrapatos foi detectada em 55% dos cães desse grupo (11/20). Já os 71 cães provenientes do bairro Portões foram considerados de origem periurbana, exceto cinco animais que se encontravam em área rural. Em relação a esse grupo, 34 dos 71 cães examinados (47,88%) estavam infestados por carrapatos.

A presença de carrapatos exclusivamente da espécie *R. sanguineus* s.l. foi observada em 40 cães (40%) nos três diferentes tipos de área/ambiente: 28 do bairro Portões (ambiente periurbano e rural), três encaminhados para esterilização cirúrgica (ambiente urbano) e nove resgatados (sem dados de origem ou de ambiente rural). Infestações exclusivas pelas espécies *A. sculptum*, *A. aureolatum*, e *R. microplus* foram observadas, individualmente, em três cães de áreas rurais do bairro Portões. Ao considerar as coinfectações, observou-se: dois cães com *A. aureolatum* e *A. sculptum*, ambos de ambientes rurais (bairro Portões e resgatado de área rural), um cão com *A. aureolatum* e *R. sanguineus* s.l., de área periurbana do bairro Portões, e um cão com *A. sculptum* e *R. sanguineus* s.l. (bairro Portões) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do número de cães infestados por ixodídeos distribuídos pelo sexo e pela origem dos cães examinados no município de Itabirito - MG.

CARRAPATOS	NÚMERO DE CÃES INFESTADOS POR SEXO		NÚMERO DE CÃES INFESTADOS POR ORIGEM		
	Machos	Fêmeas	Portões	Esterelização (Urbanos)	Resgatados (Canil)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l.	16	24	28	3	9
<i>Amblyomma aureolatum</i>	1	0	1 <sup>A</sup>	0	0
<i>Rhipicephalus microplus</i>	1	0	1 <sup>A</sup>	0	0
<i>Amblyomma sculptum</i>	1	0	1 <sup>A</sup>	0	0
<i>A. aureolatum</i> + <i>R. sanguineus</i>	1	0	1	0	0
<i>A. aureolatum</i> + <i>A. sculptum</i>	1	1	1 <sup>A</sup>	0	1 <sup>A</sup>
<i>R. sanguineus</i> + <i>A. sculptum</i>	1	0	1 <sup>A</sup>	0	0
<i>R. sanguineus</i> + <i>A. aureolatum</i>	1	0	0	0	1 <sup>A</sup>
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>11</b>

A: cães encontrados em áreas rurais.

Os dados do questionário demonstraram que em relação ao contato dos cães com o ambiente externo ao domicílio, 60,26% passeiam com os tutores, porém somente 6,08% destes sempre utilizam coleira com guia e outros 10,63% utilizam às vezes. Não houve diferença de parasitismo por carrapatos entre o grupo de cães que passeava com os tutores e os cães que não passeavam ( $p=0,6108$ ). Para fazer esta inferência estatística, foi retirado oito animais que não passeavam com os tutores, porém tinham livre acesso à rua. Não foi possível fazer inferência estatística entre animais com uso de coleira ou não devido ao baixo número amostral dos animais que sempre passeavam com coleira. Em relação ao confinamento destes animais, 43,59% (34/78) dos cães não possuíam barreiras físicas de contenção e outros 5,12% (4/78) não tinham acesso à rua, porém viviam em áreas de mata. Comparando os animais que tinham acesso à rua com aqueles confinados, não houve diferença significativa no número de animais infestados por carrapatos ( $p=0,9849$ ). Os quatro animais que viviam em matas, não entraram nessa inferência matemática. Dos 40 cães que não possuem acesso à rua, 18 passeiam com os proprietários pelo menos uma vez ao mês, podendo entrar em contato com carrapatos. Já em relação ao convívio com outros animais, 75 cães (58,5%) possuíam contato com outros animais, sendo: 29 somente com outros cães; 28 somente com cães e outros animais domésticos; e 18 com animais domésticos e silvestres. O controle da infestação por carrapatos foi realizado em 57 cães (73,07%), sendo o uso de banhos contendo antiparasitários o método mais comum, utilizado em 54,38% dos animais tratados (31/57). Os produtos e bases químicas utilizados nos banhos eram variados, sendo as suspensões carrapaticidas as mais utilizadas. Um animal (1,75%) recebia exclusivamente tratamento mensal tópico *spot on* à base de fipronil, e dois cães (3,51%) recebiam somente ivermectina por via parenteral, quando ocorria infestações por carrapatos. O método de catação manual era utilizado em oito cães (14,04%). Em treze cães (22,81%), os proprietários relataram o uso de produtos carrapaticidas, porém não souberam relatar a forma de aplicação ou qual o produto utilizado. Associações com mais de um produto foi relatado e 14 cães receberam este tipo de tratamento,

sendo: seis cães (10,53%) com associação entre propoxur e cipermetrina em banhos, três (5,26%) entre sabão antiparasitário e ivermectina, dois (3,51%) entre cipermetrina e ivermectina, um (1,72%) entre fipronil e propoxur, um (1,72%) com xampu e propoxur e um (1,72%) com fipronil e ivermectina. Em geral, os tratamentos não seguiam qualquer tipo de acompanhamento veterinário. O quadro 1 resume os produtos antiparasitários mais utilizados e os critérios de aplicação na população animal em estudo.

Quadro 1. Bases farmacológicas, métodos e critérios para a realização de tratamentos, já utilizados em uma população amostral de cães no município de Itabirito – MG.

Base farmacológica/Produto utilizado	Grupo químico	Forma de aplicação	Número de animais que passaram por tratamento	%	Critérios para a realização dos tratamentos
Propoxur	Carbamato	Banho	10	17,54	Semanal (1); Infestação de carrapatos (1); quinzenal (1) e sem frequência definida (7)
Catação	-	-	8	14,04	Presença de carrapatos
Sabonete Antiparasitário	*	Banho	3	5,26	Quinzenal (1); presença de carrapatos (2)
Ivermectina	Avermectina	Parenteral	2	3,51	Infestação por pulgas ou carrapatos
Xampu Antiparasitário	*	Banho	2	3,51	Aproveita os banhos
Amitraz	Formamidina	Banho	2	3,51	Quando o animal se coça
Fipronil	Fluocyanobenpyraz ole	Spot-on	1	1,75	Mensal
Deltametrina	Piretroide	Banho	1	1,75	Trimestral
Permetrina + Tetrametrina	Piretroides	Spray	1	1,75	Semanal
Não definido	-	-	13	22,81	-
Propoxur e Cipermetrina	-	Banho	6	10,53	Infestação por carrapatos
Sabonete Antiparasitário e Ivermectina	-	Banho e parenteral	3	5,26	Sem frequência definida (1); presença de carrapatos (1); banhos quinzenais (1)
Cipermetrina e Ivermectina	-	Banho e parenteral	2	3,51	Infestação por carrapatos
Fipronil e Propoxur	-	Spot on e banho	1	1,75	Presença de carrapatos
Xampú e Propoxur	-	Banho	1	1,75	Semanal
Fipronil e Ivermectina	-	Spot on e parenteral	1	1,75	Sem frequência definida
<b>Total de Tratamentos</b>			<b>57</b>	<b>100</b>	

\* Não foi possível saber qual a base química utilizada nestes tratamentos.

Considerando o grupo de 57 animais que passaram por tratamento, foram encontrados carrapatos em 26 destes, mostrando recorrência das infestações em 45,61% dos cães. Em 16 cães não expostos a tratamentos carrapaticidas, foram encontrados carrapatos em 7 deles (43,75%). Os proprietários que não souberam informar qual o tipo de tratamento ou qual substância utilizavam tiveram seus cães agrupados no grupo de animais tratados. Os cães de proprietários que não souberam informar se faziam controle com carrapaticidas foram retirados do cálculo estatístico (n=5). Comparando-se esses dois grupos não houve diferença estatística entre animais parasitados com histórico de algum

tratamento carrapaticida e aqueles sem tratamento ( $p=0.8793$ ). O quadro 2 discrimina os métodos de tratamento em cães que apresentaram reinfestação por carrapatos.

Quadro 2. Espécie de carrapato, método de tratamento e sua frequência e quantidade de cães encontrados parasitados, mesmo com o histórico de intervenção para controle de carrapatos.

<b>Carrapato</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Frequência</b>	<b>Quantidade</b>
<i>R. sanguineus</i> + <i>Amblyomma aureolatum</i>	Ivermectina	Não informado	1
<i>A. aureolatum</i>	Catação	Presença de carrapatos	1
<i>R. sanguineus</i>	Propoxur	15 em 15 dias	1
<i>R. sanguineus</i>	Sabonete antiparasitário	15 em 15 dias	1
<i>R. sanguineus</i>	Propoxur	Todo banho	1
<i>R. sanguineus</i>	Xampú antiparasitário	Presença de carrapatos	1
<i>R. sanguineus</i>	Catação	Não informado	1
<i>A. aureolatum</i> + <i>A. sculptum</i>	Não informado	Não informado	1
<i>R. sanguineus</i> + <i>A. sculptum</i>	Não informado	Presença de carrapatos	1
<i>R. sanguineus</i>	Propoxur + cimpermetrina	Trimestral	1
<i>A. sculptum</i>	Deltametrina	Mensal	1
<i>R. sanguineus</i>	Fipronil	Semanal	1
<i>R. sanguineus</i>	Permetrina + Tetrametrina + Piperonila	Presença de carrapatos	1
<i>R. sanguineus</i>	Sabonete antiparasitário	Presença de carrapatos	2
<i>R. sanguineus</i>	Cipermetrina	Não informado	2
<i>R. sanguineus</i>	Propoxur	Não informado	4
<i>R. sanguineus</i>	Não informado	Não informado	5
<b>Total</b>			<b>26</b>

#### 4. Discussão

A maior prevalência da espécie de carrapato *R. sanguineus* s. l., pode ser explicado pela bem-sucedida adaptação desse ixodídeo ao cão, que é um hospedeiro ineficaz em produzir uma resposta imunológica protetora, permitindo alta eficiência de infestação por esta espécie de ectoparasito (Ferreira *et al.*, 2003). Os animais da área urbana estavam infestados somente por *R. sanguineus* s.l., ixodídeo muito comum em cães, distribuído por todo o território brasileiro e com conhecida infestação em hospedeiros de ambientes urbanos (Aragão, 1936; Ribeiro *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2000; Szabó *et al.*, 2001; Labruna e Pereira, 2001; Oyafuso *et al.*, 2002; Massard e Fonseca, 2004; Dantas-Torres, 2009; Burlini *et al.*, 2010; Szabó *et al.*, 2010; Klimpel *et al.*, 2010; Heukelbach *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2018b). Entretanto, este carrapato também foi encontrado em cães de áreas periurbanas e rurais, provavelmente em razão dos cães repousarem em ambientes com construções humanas, o que permite a perpetuação do ciclo, já que fêmeas ingurgitadas necessitam de locais como frestas em paredes ou madeira para a oviposição. Esta adaptação do *R. sanguineus* s. l., permite-o manter populações em ambientes antropizados em presença de seu principal hospedeiro, o cão (Dantas-Torres, 2008b). Outros estudos realizados em cães de áreas rurais e periurbanas também relataram *R. sanguineus* s.l. coletados destes animais (Szabó *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2008; Dantas-Torres, 2009; Costa-Junior *et al.* 2012; Santos *et al.*, 2012). Foram encontradas poucas larvas de *R. sanguineus* s.l., provavelmente por sua difícil visualização no momento da catação sobre o cão. Silveira *et al.* (2009) fizeram o levantamento dos instares e o número de gerações anuais em condições naturais dos carrapatos *R. sanguineus* em Belo Horizonte, cidade com clima similar ao do município de Itabirito, e foi encontrando três gerações anuais, com pequenos picos das fases parasitárias de larvas nos meses de agosto, novembro, janeiro e abril e de ninfas em agosto, fevereiro, abril e junho. Estes pesquisadores observaram, em Belo Horizonte, que durante todo o ano há dominância das formas adultas, mantendo-se menor

número de ninfas, seguido de número ainda menor de larvas. Resultado semelhante foi observado no presente estudo em que a proporção de formas adultas foi maior em relação às formas jovens. No entanto, é importante ressaltar que as coletas de carrapatos em Itabirito não foram realizadas em um período anual e não se manteve o número de coletas constante nos meses analisados. Dessa forma, as análises em relação às gerações e às proporções dos instares devem ser cautelosas, necessitando de mais estudos sobre a dinâmica sazonal do *R. sanguineus* s.l no município em questão. Também é interessante observar que houve maior proporção de *R. sanguineus* s. l. machos encontrados nos cães. Isso pode ser explicado pelo fato de que a fêmea, após a cópula, completa o repasto sanguíneo e desprende do corpo do cão para procurar locais no ambiente para oviposição. Porém, o macho continua em processo de parasitismo por longos períodos, trocando os sítios de alimentação no mesmo cão ou podem prontamente trocar de hospedeiro em busca de novas fêmeas para continuar o processo de acasalamento. Neste contexto, o macho faz transmissão intraestadial de patógenos, tornando-os amplificadores dessas doenças (Bremer *et al.*, 2005; Little *et al.*, 2007).

A presença de ixodídeos do gênero *Amblyomma* ocorreu em cães de áreas rurais ou de região com menor densidade populacional e menor grau de urbanização, fato conhecido no ciclo de algumas espécies desses carrapatos, principalmente *A. aureolatum* e *A. sculptum* (Aragão, 1936; Ribeiro *et al.*, 1997; Labruna *et al.*, 2001a; Dantas-Torres, 2009; Costa-Junior *et al.*, 2012; Araes-Santos *et al.*, 2015). Os carrapatos desse gênero não suportam áreas sem um microambiente adequado com cobertura vegetal para completarem seu ciclo (Labruna *et al.*, 2001b; Szabó *et al.*, 2013), isso explica os cães restritos de área urbana nesse estudo não serem parasitados por essas espécies. Já o *Amblyomma ovale* é um carrapato melhor adaptado aos ciclos estritamente silvestres, sendo encontrado em carnívoros silvestres e cães caçadores (Aragão e Fonseca, 1961b). É comum o relato dessa espécie parasitando cães em contato com a mata atlântica (Barbieri *et al.*, 2014). Entretanto, a não observação dessa espécie no presente estudo se deve a sua adaptação a menores altitudes comparadas às da região pesquisada (Barbieri *et al.*, 2015; Luz e Mcintosh *et al.*, 2016) e, possivelmente, por esse motivo, não foram encontrados nos cães que tinham contato com áreas silvestres (Aragão, H. e Fonseca, 1961; Guglielmone *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2013).

A identificação do parasitismo por *A. sculptum* ocorreu em cães de regiões periurbanas e em um cão da área rural. Fatores como ambiente degradado e o clima tropical, permitem o estabelecimento das populações desta espécie em áreas além de seu habitat natural, que é o cerrado (Martins *et al.*, 2016). Em sua fase adulta, *A. sculptum* apresenta moderada especificidade parasitária, sendo encontrado principalmente em equinos no contexto de animais domesticados (Martins *et al.*, 2016). Capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e antas (*Tapirus terrestris*) são considerados os hospedeiros primários deste carrapato em ambiente silvestre, porém a fase adulta pode ser encontrada em vasta gama de outros mamíferos. As fases jovens possuem baixa especificidade parasitária quando comparada aos adultos e podem infestar vários animais silvestres, domésticos e seres humanos (Aragão 1936; Aragao e Fonseca, 1953b; Labruna *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2016). A dinâmica populacional de *A. sculptum* no sudeste do Brasil é bem conhecida. Há um ciclo anual, com distribuição das fases de vida do parasito em picos durante as estações do ano, assim as larvas prevalecem durante os meses de abril a julho, as ninfas nos meses de agosto a outubro e os adultos de outubro a março (Labruna *et al.*, 2003; Labruna *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2008). Em razão desta distribuição bem definida, foi coletado ninfas em um cão da área rural no mês de novembro coinfestado com um carrapato adulto, onde ainda há grande quantidade de ninfas nas pastagens e processo de crescimento da população de carrapatos adultos. Estes, foram encontrados em sua maioria no mês de março, época do ano onde há o final do pico desta fase do *A. sculptum*, provenientes dos picos das fases jovens dos meses secos do ano anterior.

*Amblyomma aureolatum* foi encontrado em área periurbana com menor densidade populacional e em um cão da área rural, conforme encontrado por Ribeiro *et al.* (1997). Esta espécie, comum no sudeste e sul do Brasil, tem como hospedeiro primário de suas fases imaturas os passeriformes e pequenos roedores silvestres (Guglielmone *et al.*, 2003). Este fator pode ter sido determinante

para não haver a identificação de instares imaturos desta espécie nos cães em estudo. Considerando a fase adulta deste carrapato, os carnívoros silvestres são seus principais hospedeiros no bioma de mata atlântica, porém houve adaptação deste carrapato para os cães domésticos e, portanto, estes podem ser considerados hospedeiros primários dos carrapatos adultos presentes em áreas rurais próximas desse bioma (Aragão, 1936; Guglielmone *et al.*, 2003; Pinter *et al.*, 2004; Labruna *et al.*, 2005). Assim, as faixas de temperatura amenas e a alta umidade, que são fatores comuns em área de mata atlântica e presentes na região em estudo, permite o estabelecimento de populações de *A. aureolatum* (Rodrigues *et al.*, 2002; Pereira, 2009; MYR..., 2013). Esta espécie de carrapato foi comumente associada a áreas rurais e de transição entre área urbana e silvestre por diversos autores (Aragão, 1936; Evans *et al.*, 2000; Guglielmone *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2016), corroborando com a identificação de *A. aureolatum* em cães no presente estudo. A baixa taxa de infestação provavelmente ocorreu devido à fatores de proteção relacionadas ao ambiente e a baixa densidade relativa de hospedeiros, conforme relatado por Pinter *et al.* (2004). No cão, este carrapato é vetor da *Rangelia vitalli* (Soares *et al.*, 2018) e importante em saúde pública por ser competente vetor de *Rickettsia rickettsi* (Pinter e Labruna, 2006; Parola *et al.*, 2013; Szabó *et al.*, 2013), abrindo possibilidades para a circulação destes agentes, nessa região de estudo.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* foi encontrado em um cão residente do bairro Portões que tinha contato com criações de bovinos. Embora o carrapato *R. microplus* apresente alta especificidade parasitária, em pastos com grande infestação pode ocorrer o parasitismo deste carrapato em outras espécies como o cão (Aragão, 1936; Labruna *et al.*, 2001a). É importante ressaltar que a presença de bovinos é essencial para manter este ciclo alternativo de parasitismo (Bittencourt *et al.*, 1990; Labruna *et al.*, 2001b), já que a eficiência de ovipostura desse carrapato, quando parasitando cães, é relativamente inferior à ovipostura no ciclo em bovinos (Franque *et al.*, 2007).

Assim como no presente trabalho, Silveira *et al.* (2009), em Minas Gerais, e Dantas Torres *et al.* (2009), em Pernambuco, também não observaram diferença significativa no número de cães fêmeas e machos infestados por carrapatos. A susceptibilidade a carrapatos também não apresentou diferença entre cães confinados e cães com acesso à rua em Itabirito. Isso pode ter sido observado, pois alguns cães confinados passeavam com os tutores, sendo então expostos à infestação na rua pelo contato com outros cães, principalmente devido ao hábito da maioria dos tutores de não usarem guia em seus animais. Outros fatores a se considerar são: a própria adaptação do *R. sanguineus* s.l. para manter ciclos endêmicos na região domiciliar e à capacidade desses ectoparasitos de subir em muros predispondo a invasão de domicílios vizinhos infestando novas áreas. A circulação de cães infestados em ruas próximas às residências não deve também ser descartada, já que o *R. sanguineus* s.l. tem um hábito de procurar pelo hospedeiro (Dantas-Torres, 2008; 2010). Uspensky e Uspensky (2002) demonstraram que somente uma fêmea pós cópula é capaz de infestar um ambiente com cães quando os fatores como temperatura e umidade são favoráveis. Considerando essas características do *R. sanguineus* s.l., era esperado que a exposição fora do ambiente doméstico não fosse determinante para aumento das chances de infestação por carrapatos na população de caninos estudada.

Além do aspecto ambiental, favorável à infestação de cães por várias espécies de carrapatos, o comportamento da população humana quanto à guarda responsável de cães também foi levado em consideração para a escolha do município de Itabirito na condução do presente estudo. Anteriormente, um levantamento sobre a população canina em Itabirito conduzida por Bastos (2013) demonstrou que a taxa de abandono no município foi de 3,60%. Esse dado revela uma taxa de renovação na população de cães não domiciliados que poderão servir como amplificadores de populações de carrapatos. O comportamento dos tutores quanto à guarda de cães também foi mensurado, indicando que 34,63% dos cães domiciliados, saem para passeios sem coleira, com supervisão do tutor; 19,92% dos cães domiciliados saem com o tutor, com o auxílio de guia; e 3,07% dos cães domiciliados, saem sem o acompanhamento do tutor (Bastos, 2013). No presente estudo, esses dados foram ainda mais alarmantes: apenas 6,08% dos tutores passeavam com seus

animais utilizando coleira e guia e o livre acesso à rua era permitido a 43,59% dos cães. Quando consideramos a guarda responsável dos cães, ambos estudos demonstram que, em geral, este é um problema grave desta região, porém no presente estudo a maioria dos animais eram de um bairro periférico do município, sendo observado que a própria construção das casas e comportamento dos tutores favoreceu o acesso dos animais às ruas e matas, aumentando, provavelmente, o parasitismo por diferentes espécies de carrapatos e a possibilidade de transporte desses carrapatos e patógenos por eles transmitidos para o ambiente doméstico.

O questionário demonstrou que a maioria dos tutores de cães urbanos, peri-urbanos e rurais da região em estudo já utilizou algum produto químico para o controle de carrapatos, embora, no geral, não procurem auxílio veterinário para a orientação quanto a medidas preventivas dirigidas aos seus cães. Essa atitude pode explicar a alta taxa de recidivas de infestações por carrapatos nos cães amostrados. Szabó *et al.* (2001) relataram, na cidade de Franca, em São Paulo, que a maioria dos animais da área urbana passaram por tratamento acaricida e que os cães da área rural foram menos expostos a este tratamento. Porém, não houve comparação estatística entre a susceptibilidade dos cães tratados com acaricidas e aqueles não tratados a reinfestações.

Humanos em contato com cães de áreas rurais são grupo de risco em relação aos patógenos transmitidas por carrapatos, pois estes cães têm contato com ambientes silvestres podendo atuar como carreadores de carrapatos para o ambiente doméstico, além de servirem como reservatórios de patógenos zoonóticos (Szabó *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2013). O uso indiscriminado de parasiticidas, a falta de seleção criteriosa da droga e a aplicação incorreta do produto podem ainda favorecer a seleção de populações resistentes de carrapatos (Fernandes *et al.*, 2001; Coles e Dryden, 2014). Estes fatores foram provavelmente determinantes para a falha no controle demonstrado entre os animais que passaram por algum tratamento acaricida no presente estudo. Santana *et al.* (2013) e Amaral *et al.* (2011) fizeram pesquisa por meio de questionário epidemiológico relacionando informações sobre a susceptibilidade de bovinos a altos índices de infestação em relação à percepção dos proprietários sobre o entendimento dos métodos de controle e encontraram uma falta de critérios para medidas de prevenção e controle de *R. microplus* nesses animais, semelhante ao ocorrido com os tutores de cães do presente estudo. Maurelli *et al.* (2018) fizeram uma extensa pesquisa sobre infestação e distribuição de carrapatos em cães da Itália. Diferente do que foi encontrado no cenário de Itabirito, os tratamentos parasitários foram protetivos contra carrapatos de diversas espécies. Outra medição importante demonstrada por estes autores foi a diferença entre os tipos de tratamentos realizada nos cães, sendo que o tratamento oral foi o mais protetivo em relação ao spot-on e coleiras impregnadas com acaricidas. Uma diferença marcante entre as pesquisas é que a população de cães selecionada por Maurelli *et al.* (2018) estava em clínicas veterinárias da Itália e, portanto, aumentando as chances de tutores seguirem critérios técnicos para o controle de ectoparasitos. Não foram encontrados estudos referentes à percepção do controle e prevenção de carrapatos em cães e o impacto epidemiológico dessa intervenção indiscriminada nos animais e no ambiente. Esta dissertação demonstra que o uso não criterioso de acaricidas não foi capaz de gerar impacto na prevenção de carrapatos quando observados os aspectos epidemiológicos em uma determinada população de cães a campo. Porém, outros estudos baseados nessa investigação devem ser feitos para medirem grau de resistência parasitária de carrapatos em cães, comparação entre métodos de controle, acompanhamento ao longo do tempo em cães tratados com produtos antiparasitários e melhores métodos de controle que possam ser disseminados entre a população de proprietários de cães.

## 5. Conclusões

- O carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l. pode ser encontrado em cães de todas as regiões avaliadas no estudo: urbana, periurbana e rural;
- *Rhipicephalus microplus* pode parasitar cão com acesso a pastagem na região avaliada;

- As espécies de carrapatos *A. aureolatum* e *A. sculptum* parasitam a população canina das regiões rural e periurbana avaliadas;
- Não há diferença na chance de se infestar por carrapatos considerando: sexo, acesso à rua ou confinamento e entre o grupo de cães tratados com acaricidas e não tratados;
- Cães podem carrear para o ambiente doméstico espécies de carrapatos com potencial de causar parasitismo em seres humanos, permitindo um possível fluxo de patógenos de caráter zoonótico para a população humana de Itabirito;
- Há utilização de produtos acaricidas sem orientação veterinária adequada, predispondo a resultados de controle ineficazes, à seleção de populações multi-resistentes de carrapatos e ao risco de transmissão de agentes patogênicos tendo como vetores os carrapatos;
- Devido ao perfil da população humana de Itabirito, deve-se realizar educação em saúde em relação à guarda responsável de cães.

## **Capítulo 2: DETECÇÃO DE HEMOPATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS POR MEIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO EM CÃES NO MUNICÍPIO DE ITABIRITO, REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL**

### **Resumo**

Os patógenos transmitidos por carrapatos no Brasil possuem grande importância na clínica médica veterinária de cães, principalmente aqueles transmitidos por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) devido à sua ampla distribuição pelo território brasileiro e adaptação ao cão. Assim, agentes como o *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli* são endêmicos em grande parte do país. O município de Itabirito é localizado na região central do estado de Minas Gerais e possui características epidemiológicas que permitem o estabelecimento de carrapatos do gênero *Amblyomma* e *R. sanguineus* s.l. em cães. A possível presença desses carrapatos vetores permite que agentes transmitidos por eles possam estar circulando na população canina dessa região. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de hemopatógenos em circulação na população canina de Itabirito, englobando animais de áreas urbana, peri-urbana ou rural. Foram coletadas amostras de sangue de 100 cães residentes no município, sendo 71 domiciliados no bairro Portões, 20 mantidos no canil municipal após resgate e nove oriundos do programa de castração da prefeitura. O diagnóstico baseou-se em análise molecular por meio da reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) para identificação de hemopatógenos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* e por meio da reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), para identificação de hematozoários do gênero *Hepatozoon*, *Babesia* e *Rangelia*. Foi realizado sequenciamento nucleotídico para identificação específica dos agentes encontrados. O diagnóstico de *E. canis* e *A. phagocytophilum* foi também realizado por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), não sendo realizado este método para outras espécies de hemopatógenos. Na análise molecular, houve amplificação em 17/100 das amostras, com o gene alvo 16S rRNA para membros da família Anaplasmataceae com tropismo por granulócitos ou plaquetas (EG); em 9/100 das amostras para o gene de *Piroplasma* SSU rDNA; em 7/100 das amostras para o gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.; em 5/100 das amostras para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. e 1/100 amostra para o gene *msp4* de *A. phagocytophilum*. Considerando os resultados do sequenciamento, foi possível identificar a circulação de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*. No diagnóstico sorológico utilizando a RIFI, foi possível detectar 19/100 amostras reativas para *E. canis* na diluição 1:40 e 6/100 para *A. phagocytophilum*, sendo: uma amostra na diluição 1:40, duas 1:80, duas 1:160 e uma 1:320.

Conclui-se que há a circulação de hemopatógenos transmitidos por carrapatos em cães no município de Itabirito, sendo necessários mais estudos para a definição da epidemiologia desses agentes e a confirmação da circulação de *A. phagocytophilum* e *Rangelia vitalli*. Outras pesquisas referentes a outros agentes associados à transmissão por carrapatos e de importância na saúde pública, como a *Rickettsia rickettsi*, devem também ser executadas.

Palavra-chaves: hemoparasitos, PCR, RIFI, canino

### Abstract

In Brazil, tick-borne diseases have been the major role in the veterinary medical clinic of dogs, mostly those transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. This occurs because this tick is spread throughout the Brazilian territory and it is very adapted to the parasitism on the dog. Therefore, pathogens like *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia vogeli* are endemic in the country. Itabirito County is located in the central region of the Minas Gerais state and has the epidemiologic characteristics that allowed the establishment of ticks in dogs of *Amblyomma* genus and *R. sanguineus* s.l. The possible presence of these vector ticks allowed that agents transmitted by them can be circulating in the canine population from this region. The aim of this study was identify species of hemopathogens circulating in canine population from Itabirito, encompassing animals from urban, peri-urban and rural areas. Blood from 100 dogs was collected in this study, being 71 domiciliated in Portões District, 20 rescued stray dogs and nine domiciliated dogs which were sent to castration campaign. The diagnosis of hemopathogens was performed using the nested polymerase chain reaction (nPCR) for identify *Ehrlichia* and *Anaplasma* genus, and conventional polymerase chain reaction (PCR) for identify *Hepatozoon*, *Babesia* and *Rangelia* genus. The detection of agents at species level was performed by nucleotidic sequencing. Furthermore, it was performed the serologic diagnosis for *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* by indirect fluorescence antibody technique (IFAT). For others hemopathogens transmitted by ticks, this method was not used. In the molecular analysis 17% of samples were amplified using primers for 16S rRNA belongs to the granulocytic and trombocytic Anaplasmataceae members. For SSU rDNA gene from Piroplasm 9% of samples were amplified; 7% samples were amplified for the 18S rRNA gene for *Hepatozoon* spp.; 5% of samples were amplified for *dsb* gene from *Ehrlichia* spp., and 1% of samples were amplified using *msp4* gene as target for *A. phagocytophilum*. By the serological diagnosis were detected 19% reactive samples for *E. canis* in 1:40 dilution and 6% reactive samples for *A. phagocytophilum* in the following dilutions: 1 dog - 1:40; 2 dogs - 1:80; 2 dogs - 1:160; and 1 dog - 1:320. In conclusion, it was possible to detect the circulation of hemopathogens transmitted by tick bites in dogs from Itabirito County, and it is necessary more investigation for better understanding of epidemiology for these agents and the confirmation of *A. phagocytophilum* and *Rangelia vitalli* pathogens in this area. It is also important to mention that more investigation about other pathogens associated with tick bites and that were not include in this study like *Rickettsia rickettsi* must be evaluated.

Keyword: hemoparasites, PCR, IFAT, canine

### 1. Introdução

No Brasil, considerando as doenças que podem acometer os cães, aquelas causadas por patógenos transmitidos por carrapatos possuem posição de destaque em prevalência e importância, pois podem levar alguns animais a desenvolverem quadro de doença grave e os levarem a óbito (Bastos *et al.*, 2004; Trapp *et al.*, 2006b; Vieira *et al.*, 2018a). Considerando este grupo de agentes, aqueles transmitidos por *R. sanguineus* s.l. são mais prevalentes, pois a ampla distribuição do vetor pelo território brasileiro e adaptação ao cão predispõe para que ocorra este cenário (Aragão e Fonseca, 1961a; Szabó *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2018b). Neste contexto, os principais hemopatógenos de cães transmitidos por carrapatos de ocorrência no Brasil são da família Anaplasmataceae, como

*Anaplasma platys* – provável transmissão pelo *R. sanguineus* s. l. (Ramos *et al.*, 2014) – e *E. canis* e protozoários da espécie *Babesia vogeli* (Dantas-Torres e Figueredo, 2006; Vieira *et al.*, 2011). Já *Hepatozoon canis* é frequentemente encontrado infectando cães no Brasil (Lasta *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2015) e, em experimentos realizados em outras partes do mundo, o carrapato transmissor é o *R. sanguineus* s. l. (Baneth *et al.*, 2007; Giannelli *et al.*, 2013). No entanto, infecções experimentais para demonstrar a participação de *R. sanguineus* s.l. na transmissão de *H. canis* no Brasil falharam (Forlano *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010; Demoner *et al.*, 2013). Apesar do insucesso na transmissão de *H. canis* por *R. sanguineus* s.l. no Brasil, foi demonstrado a possível participação do carrapato *Amblyomma ovale* na transmissão (Forlano *et al.*, 2005; Demoner *et al.*, 2013). Dessa maneira, outras rotas epidemiológicas de infecção devem ser estudadas (Demoner *et al.*, 2013). Cães podem ainda ser infectados por outros hemopatógenos transmitidos por carrapatos em circulação no Brasil, tais como *Rangelia vitalli*, transmitido pelo *Amblyomma aureolatum* (Soares, J. F. *et al.*, 2018), *Rickettsia rickettsi* (Labruna *et al.*, 2009), transmitido principalmente pelo *Amblyomma sculptum* e *A. aureolatum* (Moraes-Filho *et al.*, 2009) e outros três agentes sem a confirmação do carrapato vetor: *B. gibsoni* (Trapp *et al.*, 2006a), *E. ewingii* (Oliveira *et al.*, 2009a) e *A. phagocytophilum* (Santos *et al.*, 2013).

O agente *E. canis* é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória, que se desenvolve no interior das células eucarióticas de seus hospedeiros em vacúolos originários da membrana plasmática da célula parasitada, formando uma estrutura denominada mórula. Possui tropismo por células da linhagem monocítica, principalmente monócitos, sendo associada à doença erliquiose monocítica canina (EMC) (McDade, 1990; Dumler *et al.*, 2001; Mylonakis e Konstantina, 2017). A transmissão de *E. canis* pelo carrapato é transestadial (Groves *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 1976) e em carrapatos machos pode ocorrer transmissão intraestadial, amplificando a transmissão para os cães (Bremer *et al.*, 2005). É reconhecido que sua transmissão ocorre após poucas horas do início do repasto sanguíneo (Fourie *et al.*, 2013), o que dificulta o controle e a prevenção da doença em estratégias baseadas em acaricidas (Jongejan *et al.*, 2016). A infecção em humanos por *E. canis* ocorre de maneira esporádica (Perez *et al.*, 1996, 2006), mas em cães, este agente causa uma doença cosmopolita e endêmica em todo o território brasileiro, com exceção do estado do Rio Grande do Sul (Aguiar *et al.*, 2007a, 2007b; Vieira *et al.*, 2011; Krawczak *et al.*, 2012; Lasta *et al.*, 2013; Spolidorio *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015; Rotondano *et al.*, 2017). Os cães são considerados o reservatório de *E. canis* por permanecerem infectados por longos períodos, além de serem eficientes na transmissão do patógeno aos carrapatos (Groves *et al.*, 1975). A EMC é uma doença complexa que pode ser arbitrariamente dividida em três fases: aguda, subclínica e crônica (Harrus *et al.*, 1997; Sykes, 2010). Os cães em fase aguda desenvolvem os sinais clínicos típicos da doença, sendo os achados laboratoriais mais comuns uma trombocitopenia, anemia arregenerativa e hipergamaglobulinemia (Harrus *et al.*, 1996, 2012; Harrus *et al.*, 1997; Waner *et al.*, 2000; Almosny e Massard, 2002; Munhoz *et al.*, 2012). Alguns animais podem se recuperar da fase aguda e debelar a infecção. Quando isto não ocorre, podem entrar em uma fase subclínica onde é comum encontrar alterações hematológicas, principalmente trombocitopenia, sem sinais clínicos (Sykes, 2010; Mylonakis e Konstantina, 2017). Após um período em fase subclínica, alguns animais pode desenvolver a fase crônica com sinais clínicos graves, que pode levar a distúrbios hematológicos, depleção medular e morte por doenças bacterianas secundárias ou hemorragias (Buhles *et al.*, 1975; Mylonakis *et al.*, 2004; Harrus e Waner, 2011). É comum ocorrerem coinfeções com outros hemopatógenos devido ao vetor em comum, o que pode aumentar a gravidade da doença (Gal *et al.*, 2007; Gaunt *et al.*, 2010; Low *et al.*, 2018).

Outro membro da família Anaplasmataceae considerado endêmico no Brasil é o *A. platys* que causa a trombocitopenia cíclica infecciosa canina (Cardozo *et al.*, 2007; Costa-Júnior *et al.*, 2013; Lasta *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2018b). Estes organismos são bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias que infectam plaquetas e geralmente não estão associados a doença clínica em cães, sendo geralmente associada ao agravamento de outras doenças, embora possam causar trombocitopenia transitória e cíclica com aproximadamente duas semanas entre os

episódios e anemia, além de outros sinais clínicos comuns às outras hemoparasitoses. Em algumas regiões do mediterrâneo, há uma cepa mais patogênica (Dumler *et al.*, 2001; Beaufils *et al.*, 2002; Inokuma *et al.*, 2002; Gaunt *et al.*, 2010). A epidemiologia deste patógeno ainda não é completamente compreendida (Ribeiro *et al.*, 2017). *Anaplasma platys* pode possuir potencial zoonótico, pois foi demonstrado material genético deste agente em uma médica veterinária em contato com animais na Irlanda, África do Sul e Granada (Maggi *et al.*, 2013) e em duas mulheres na Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014).

A babesiose canina no Brasil é causada principalmente por *B. vogeli* (Passos *et al.*, 2005; Trapp *et al.*, 2006b; Costa-Júnior *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2015), sendo considerada uma doença endêmica em todo o país (Dantas-Torres e Figueredo, 2006). A transmissão deste patógeno é transestadial e transovariana e ocorre em carrapatos da espécie *R. sanguineus*, sendo necessário dois a três dias para ativação do patógeno nas glândulas salivares deste vetor (Mehlhorn e Schein, 1985, 1993; Chauvin *et al.*, 2009). Nos cães, a infecção tende a ser crônica e, muitas vezes, assintomática, podendo perdurar a infecção durante toda a sua vida. Dessa maneira, o *R. sanguineus* e o cão podem ser considerados os reservatórios de *B. vogeli* (Trapp *et al.*, 2006b; Chauvin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). Os sinais clínicos são variáveis, sendo a *B. vogeli* a espécie causadora de babesiose canina menos patogênica, geralmente causando alterações em cães esplenectomizados, em estado de imunodepressão ou que apresentem comorbidades. Cães jovens podem apresentar doença hiperaguda que leva a morte (Uilenberg *et al.*, 1989; Schettters *et al.*, 1997; Zahler *et al.*, 1998; Carret *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Penzhorn, 2011; Birkenheuer, 2013; Wang *et al.*, 2018). Entre as alterações hematológicas comumente encontradas estão trombocitopenia, anemia hemolítica regenerativa e icterícia leve a moderada (Bicalho *et al.*, 2002; O'Dwyer e Massard, 2002a; Bastos *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2008; Schoeman, 2009).

A infecção de cães por *H. canis* é associada com a ingestão de carrapatos contendo oocistos esporulados. Nos tecidos dos cães, há a formação de esquizontes e no carrapato é onde ocorre a reprodução sexuada. Neste vetor, a transmissão é transestadial (O'Dwyer *et al.*, 2001; Demoner *et al.*, 2013). Porém, rotas alternativas de transmissão precisam ser investigadas para melhor compreensão da epidemiologia deste patógeno no Brasil (Demoner *et al.*, 2013). *Hepatozoon canis* é frequentemente encontrado no Brasil, porém a sintomatologia associada a este parasito é controversa. Os cães podem ser assintomáticos e há associação a sinais clínicos mais intensos em casos de coinfeções com outras hemoparasitoses (Mundim *et al.*, 1992; O'Dwyer *et al.*, 2001; O'Dwyer e Massard, 2002b; Paludo *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2004; Lasta *et al.*, 2009). Lesões teciduais, quando presentes, são encontradas particularmente em tecidos hemolinfáticos, musculatura esquelética, pulmões e rins (Paludo *et al.*, 2003).

O agente causador da rangelirose, *R. vitalli*, foi encontrado associado a canídeos silvestres e cães de ambiente periurbanos e rural (Loretti e Barros, 2004; Fighera *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2016a), possuindo relatos, até o momento, no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (França *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2017). A transmissão em carrapatos ocorre de maneira transestadial e transovariana (Soares *et al.*, 2018). Os sinais clínicos comumente associados à rangelirose são anemia, febre, icterícia, esplenomegalia, linfadenomegalia, hemorragia gastrointestinal, hemorragias na ponta e na parte externa da orelha, nariz e cavidade oral. É comum ocorrer anemia hemolítica extra-vascular regenerativa associado a uma trombocitopenia imunomediada, que pode evoluir para diátese hemorrágica ou coagulação intravascular disseminada (França *et al.*, 2010, 2013; Silva *et al.*, 2011). Outras alterações são plasma ictérico, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (Paim *et al.*, 2013).

O presente estudo tem como objetivo identificar os principais hemopatógenos em circulação na população canina de Itabirito (Minas Gerais), município que apresenta características epidemiológicas para o desenvolvimento de população de carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*, vetores de agentes causadores de doenças de cães, sendo alguns desses agentes potencialmente zoonóticos.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Área de Estudo

O município de Itabirito localiza-se na região central do estado de Minas Gerais (Figura 1 – capítulo 1). Pertence à região do “quadrilátero ferrífero” e está a 55 km da capital Belo Horizonte. O levantamento da população humana residente, realizado em 2014, é de 49.203 habitantes. O município ocupa uma área de 541,93 km<sup>2</sup> e possui temperatura média anual de 18,5°C. Possui o relevo do tipo mares de morro. O clima da cidade configura como tropical de altitude, com período seco de junho a agosto e a época de chuvas entre novembro e março. A cidade é roteiro turístico, o que determina uma população flutuante anual, sendo possível que cães de outras regiões se infestem por carrapatos presentes na mata ou em áreas periurbanas. A região possui uma área delimitada por um bioma fragmentado de mata atlântica, além de demarcada transição com o cerrado brasileiro. Propriedades rurais separam os fragmentos de mata em relação ao ambiente urbano em expansão no centro (Figura 2 – capítulo 1) (Itabirito, [s.d.] ; Myr..., 2013).

### 2.2 População e amostragem do estudo

Dados sobre a população canina foram levantados por censo conduzido pelo Centro de Controle de Zoonoses do município e a razão homem/cão descrita foi de 5,2:1 em 2011 (Bastos, 2013). Dessa maneira, estimou-se o número total de indivíduos em aproximadamente 9.462 cães. O tamanho estimado da amostra para o presente estudo foi realizado pelo software Epi Info versão 7.2.1.0 utilizando a aba “population survey”. Como não se sabe a prevalência das doenças em estudo, determinou-se uma estimativa de 50% de cães infectados com uma margem de erro aceitável de 10% (Naing *et al.*, 2006). Em um intervalo de confiança de 95% foi determinado uma amostra aleatória mínima de 95 cães, porém houve a restrição de que esses cães não poderiam estar em tratamento prévio com agentes antimicrobianos que afetem as rickettsias em estudo e/ou babesídeos.

A amostra foi composta por 71 cães domiciliados no bairro Portões, 20 cães provenientes de resgate e mantidos no canil municipal, cujas localizações não foram obtidas e nove cães de diversas localizações dentro do município encaminhados por demanda espontânea para castração na prefeitura de Itabirito (Figura 3 – capítulo 1). A escolha do bairro Portões (Figura 4 – capítulo 1) para a realização da maioria das coletas em cães ocorreu devido a área apresentar porções de mata preservada, conforme pode ser observado em uma das residências do bairro ilustrada na figura 5 – capítulo 1. No mesmo bairro é ainda possível observar ambiente periurbano com áreas de abertura de condomínios e pastagens (Figura 6 – capítulo 1) e presença de cães com livre acesso à rua/pastagem/mata.

Todos os tutores de cães receberam o termo de consentimento livre esclarecido (Apêndice II), bem como houve anuência da prefeitura municipal de Itabirito – MG para a realização das coletas em cães sob o poder do município (Anexo I). O presente projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) sob o número 290/2017 (Anexo II).

### 2.3 Coletas

Foi realizada a coleta de sangue total por meio de venopunção da veia cefálica (Figura 1A) ou jugular (Figura 1B) em 100 cães e este material foi acondicionado em tubos identificados individualmente contendo EDTA.



Figura 1 – Coleta de sangue por venopunção em cães do bairro Portões. A: coleta em veia cefálica. B: coleta em veia jugular.

O sangue coletado foi acondicionado em caixa isotérmica com gelo até chegar ao laboratório de Protozoários e Rickétsias da Escola de Veterinária da UFMG. No laboratório foram separadas alíquotas de sangue total e alíquotas de plasma e ambos foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos testes moleculares e sorológicos.

## 2.4 Análises moleculares

### 2.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se um volume de 300  $\mu\text{l}$  das amostras de sangue total com EDTA por meio do kit de purificação Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Protozoologia Veterinária, ICB/UFMG. Para a amplificação de DNA foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e a *nested* PCR (*nPCR*), que consiste em duas reações de PCR da mesma amostra para aumentar a sensibilidade. Foram realizados testes para o diagnóstico das rickétsias da família Anaplasmataceae e protozoários dos gêneros *Babesia* e *Hepatozoon*. Os iniciadores utilizados e os genes alvo foram descritos no Quadro 1.

Os controles positivos das reações foram amostras de DNA extraídas de células de carrapatos da linhagem IDE8 infectadas com *A. phagocytophilum* e amostras de sangue oriundas de cães experimentalmente infectados com *E. canis* e *B. vogeli*. Amostras positivas de campo para *Hepatozoon canis*, confirmadas por sequenciamento nucleotídico, foram utilizadas como controle positivo na reação para identificação deste gênero. Como branco da reação para indicação de não contaminação de todas as reações, foi utilizada água bidestilada miliQ.

As reações foram preparadas utilizando-se 1  $\mu\text{l}$  da solução com DNA molde, 5,0  $\mu\text{l}$  de GoTaq<sup>®</sup>Master Mix (1X), 0,2  $\mu\text{l}$  de cada iniciador (10 $\mu\text{M}$ , cada) e 3,6  $\mu\text{l}$  de água livre de nucleases (MiliQ), (Promega Corporation, 2016). Uma modificação dos volumes citados foi adotada na reação com os iniciadores Piro A e Piro B, seguindo: 7,5  $\mu\text{l}$  GoTaq<sup>®</sup>Master Mix (1X), 0,4  $\mu\text{l}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ , cada), 2  $\mu\text{l}$  de DNA molde e 5,1 de água MiliQ.

Quadro 1. Iniciadores utilizados para identificação das hemoparasitoses de cães

Especificidade	Iniciador: sentido 5'→3'	Nome	Alvo	Tamanho esperado dos amplicons	Fonte do desenho do Iniciador
<i>A. phagocytophilum</i>	Senso: ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG	MSP4AP5	msp4	849 pb	(De La Fuente <i>et al.</i> , 2005)
	Primeira reação Atisenso: TAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	MSP4AP3			
Segunda reação	Senso: CTATTGGYGGNGCYAGAGT	<i>msp4f</i>	msp4	381 pb	(Bown <i>et al.</i> , 2007)
	Atisenso: GTCATCGAAAATCCGTGGTA	<i>msp4r</i>			
<b>Anaplasmataceae de monócitos (EM)</b>	Senso: ACGGACAATTGCTTATAGCCTT	NS16SCH1F	16S rRNA	1195 pb	(Kawahara <i>et al.</i> , 2009)
	Primeira reação Atisenso: ACAACCTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1R			
Segunda reação	Senso: GGGCACGTAGGTGGACTAG	NS16SCH2F	16S rRNA	443 pb	(Kawahara <i>et al.</i> , 2009)
	Atisenso: CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2R			
<i>Ehrlichia spp</i>	Senso: GATGATGTCTGAAGATATAAACAAAT	Dsb-330	<i>dsb</i>	378 pb	(Doyle <i>et al.</i> , 2005)
	Reação única Atisenso: CTGCTCGTCTATTTACTTCT TAAAGT	Dsb-728			
<b>Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas (EG)</b>	Senso: CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	GE3a	16S rRNA	932 pb	(Massung <i>et al.</i> , 1998)
	Primeira reação Atisenso: TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE10r			
Segunda reação	Senso: AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT	GE9f	16S rRNA	546 pb	(Massung <i>et al.</i> , 1998)
	Atisenso: GGCAGTATTTAAAAGCAGCTCCAGG	GE2			
<b>Piroplasmas (<i>Babesia spp.</i>; <i>R. vitalli</i>)</b>	Senso: AATACCCAATCCTGACACAGGG	Piro A	SSU rDNA	408 pb	(Olmeda <i>et al.</i> , 1997)
	Reação única Atisenso: TTAAATACGAATGCCCCAAC	Piro B			
<i>Hepatozoon spp.</i>	Senso: CGCGAAATTACCCAATT	HEP-1	18S rRNA	660-680 pb	(Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2006)
	Reação única Atisenso: TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT	HEP-4			

As condições de temperatura e tempo para as duas reações de Anaplasmataceae de granulócitos e plaquetas (EG), Anaplasmataceae de monócitos (EM) e *A. phagocytophilum*, foram estabelecidas de acordo com Silveira *et al.* (2014). Já para as reações utilizando os iniciadores Piro A/ Piro B, as condições adotadas seguiram recomendações de acordo com Carret *et al.*

(1999). Os ciclos para a amplificação de *Hepatozoon* sp. foram realizados segundo Rubini *et al.* (2008). As temperaturas e tempos de cada ciclo das reações estão descritas no Quadro 2.

Os produtos amplificados na PCR foram corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), utilizando 5 µl de produto e 2 µl do corante, aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a eletroforese com um campo elétrico de 100 milivolts e 400 amperes por 25 minutos. O tampão utilizado no gel e na solução de corrida foi o TAE (Tris-acetato-EDTA) a 0,5 X. O padrão de peso molecular aplicado foi o 1Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi analisado sob luz ultravioleta utilizando transluminador.

As amostras que apresentaram amplificação, na *n*PCR para Anaplasmataceae de monócitos (EM), foram encaminhadas para o Laboratório de Virologia e Rickettsioses do Hospital Veterinário Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT para realização de PCR convencional utilizando um fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. e posterior sequenciamento nucleotídico, segundo Aguiar *et al.* (2007b).

Quadro 2. Condições de tempo e temperatura aplicadas para amplificação de DNA dos hemopatógenos em estudo.

Passo	Reação EG/ EM/ A. <i>phagocytophilum</i>			Reação Piro A/ Piro B			Reação gênero <i>Hepatozoon</i>		
	Ciclos	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Ciclos	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Ciclos	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Desnaturação inicial	1 x	5	94	1 x	5	94	1 x	3	94
Desnaturação	29 x	1	94	30 x	1	94	35 x	1	94
Anelamento		1	54		1	55		2	57
Extensão		2	72		1	72		2	72
Extensão final	1 x	8	72	1 x	5	72	1 x	7	72

#### 2.4.3 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento nucleotídico

Algumas amostras que apresentaram amplificação de material genético foram purificadas e encaminhadas para confirmação por sequenciamento nucleotídico. Novas reações dessas amostras foram realizadas em duplicata ajustando os valores para 25 µl. Após essa reação, a concentração e pureza das amostras de ácido nucleico foram mensuradas por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™. Os produtos foram purificados com polietilenoglicol (PEG) a 20%, para eliminação de bandas com tamanhos menores que 300-400 pb (de acordo com <http://labs.icb.ufmg.br/lbem/protocolos/peg.html>). Posteriormente, as amostras foram reidratadas em volume proporcional com água MiliQ até se atingir a concentração inicial do produto da PCR.

Para cada amostra a ser sequenciada, preparou-se uma mistura de DNA, primer e H<sub>2</sub>O, seguindo as instruções do laboratório Myleus® (<http://facility.myleus.com/>), para o qual as amostras foram encaminhadas para sequenciamento utilizando o método de sanger. Cada amplicon foi sequenciado duas vezes: uma com o primer “senso” e outra com o “antisense”.

As amostras sequenciadas foram analisadas usando o programa “Electropherogram quality analysis” (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e, quando possível, formou-se a fita consenso, utilizando o mesmo programa. Para a identificação dos hemopatógenos, as sequências nucleotídicas foram alinhadas com outras bases homólogas depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando o *software* Blast® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 2.5 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico foi realizado por RIFI a partir do plasma das amostras (n=100), pesquisando-se separadamente *E. canis* e *A. phagocytophilum*. Foi utilizado anticorpo anti-IgG

de cão, marcado com o fluoróforo FITC. Os antígenos utilizados para a confecção das lâminas de RIFI foram provenientes dos isolados de *E. canis* e *A. phagocytophilum* cultivados em linhagem celular de carrapatos IDE8 mantidas no Laboratório de Protozoologia Veterinária do ICB/UFMG, conforme Silveira *et al.* (2017).

O ponto de corte para determinar se o animal é reagente a *E. canis* foi de 1:40 (Aguiar *et al.*, 2007a). Para triagem dos animais reagentes para *A. phagocytophilum* foi determinado o corte na diluição 1:40, sendo realizado a diluição seriada até 1:640 nos animais inicialmente reagentes. Esta metodologia visa evitar reações cruzadas com outros agentes da família Anaplasmataceae, principalmente *A. platys* (Silveira *et al.*, 2017). Para outros hemopatógenos de cães, não foram realizados exames sorológicos por indisponibilidade de antígenos para RIFI.

### 3. Resultados

#### 3.1 Análises moleculares

Das 100 amostras analisadas molecularmente, 32% apresentaram-se positivas para pelo menos um dos hemopatógenos testados (Quadro 3). Dezesete cães foram positivos para agentes granulocíticos ou de plaquetas da família Anaplasmatacea (EG) (Figura 2A). A partir do sequenciamento dessas 17 amostras, apenas uma apresentou qualidade, demonstrando se tratar de *A. platys* (identidade de 99,18%). Ainda em relação às espécies granulocíticas, dos 100 animais, um era positivo para *A. phagocytophilum* quando se realizou o *n*PCR com iniciadores para essa espécie. O sequenciamento dessa amostra foi realizado, mas não se obteve resultado satisfatório. Quando as amostras foram testadas para espécies monocíticas da família Anaplasmataceae (EM), 14 delas foram positivas. Com o intuito de realizar o sequenciamento, essas 14 amostras foram submetidas à reação de PCR com iniciadores para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. e cinco delas foram positivas. O sequenciamento das amostras positivas, com o posterior alinhamento entre elas, demonstrou identidade de 100% com a espécie *E. canis*. A partir dos iniciadores para hemoprotozoários, nove amostras foram positivas para piroplasmas (Figura 2B) e sete para *Hepatozoon* spp. (Figura 2C). Duas das amostras positivas para piroplasmas e uma para *Hepatozoon* spp. foram enviadas ao sequenciamento confirmando as espécies *B. vogeli* (identidade de 92% e 99,49%) e *Hepatozoon canis* (identidade de 99,55%), respectivamente. Os consensos formados após o sequenciamento das amostras podem ser observados no apêndice III. O gráfico 1 representa a quantidade de amostras que obtiveram amplificação ao serem submetidas aos testes moleculares propostos neste capítulo. As amostras que obtiveram sucesso no sequenciamento serão depositadas no GenBank.

Todos os cães da castração (n=9) foram negativos para os patógenos em estudo. Em relação aos cães resgatados e mantidos no canil municipal (n=20), segundo a veterinária responsável, dois vieram de uma mesma propriedade rural (comunicação pessoal, 2018), sendo que um deles foi positivo para *Hepatozoon* spp. Dentre os outros animais resgatados de locais desconhecidos e mantidos no canil municipal, um cão era positivo de *E. canis* e outro foi positivo para dois tipos de agentes: *E. canis* e piroplasmas. Quanto às amostras provenientes do bairro Portões (n=71), houve amplificação de EG em 13 amostras, de *E. canis* em três amostras, de piroplasmas em cinco amostras e de *Hepatozoon* spp. em quatro amostras. As coinfeções de EG e piroplasma ocorreram em duas amostras, de *Hepatozoon* spp. e piroplasmas em uma amostra, de EG e *A. phagocytophilum* em uma amostra, e de *Hepatozoon* spp e EG em uma amostra (dados compilados no quadro 3).

Quadro 3. Distribuição do número de amostras amplificadas por PCR ou *n*PCR

Patógenos Alvo	Número (%) de Amostras Amplificadas	Proveniência das Amostras
(EG)	13/32 (40,62%)	Portões
<i>E. canis</i>	3/32 (9,37%)	Portões (n=2); Resgatado (n=1)
Piroplasmas	5/32 (15,62%)	Portões
<i>Hepatozoon</i> spp.	4/32 (12,50%)	Portões (n=3); Rural – Resgatado (n=1)
EG + Piroplasmas	2/32 (6,25%)	Portões
<i>E. canis</i> + Piroplasma	1/32 (3,13%)	Resgatado
<i>E. canis</i> + <i>Hepatozoon</i> spp.	1/32 (3,13%)	Portões
Piroplasmas + <i>Hepatozoon</i> spp.	1/32 (3,13%)	Portões
EG + <i>A. phagocytophilum</i>	1/32 (3,13%)	Portões
<i>Hepatozoon</i> spp. + EG.	1/32 (3,13%)	Portões
<b>Total de amostras positivas</b>	<b>32 (100%)</b>	

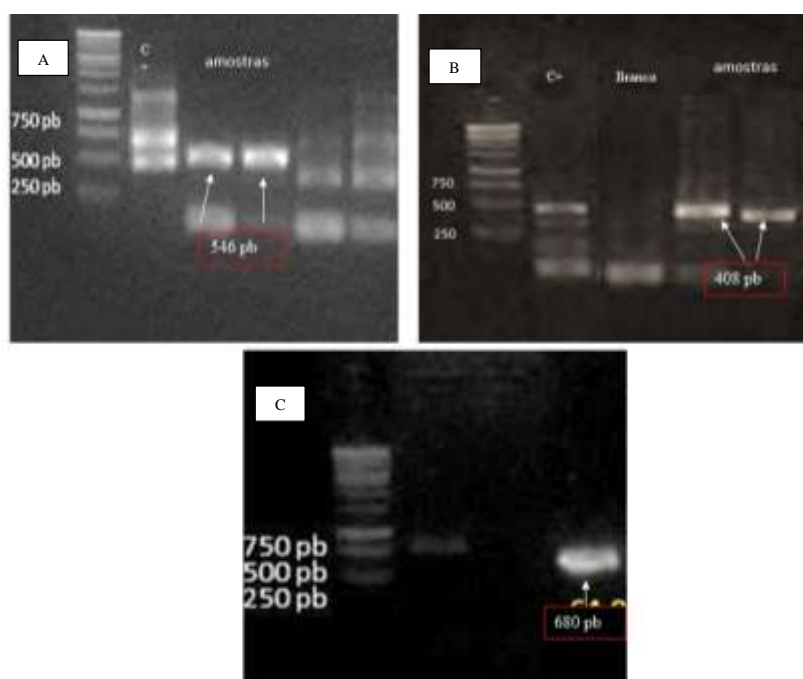
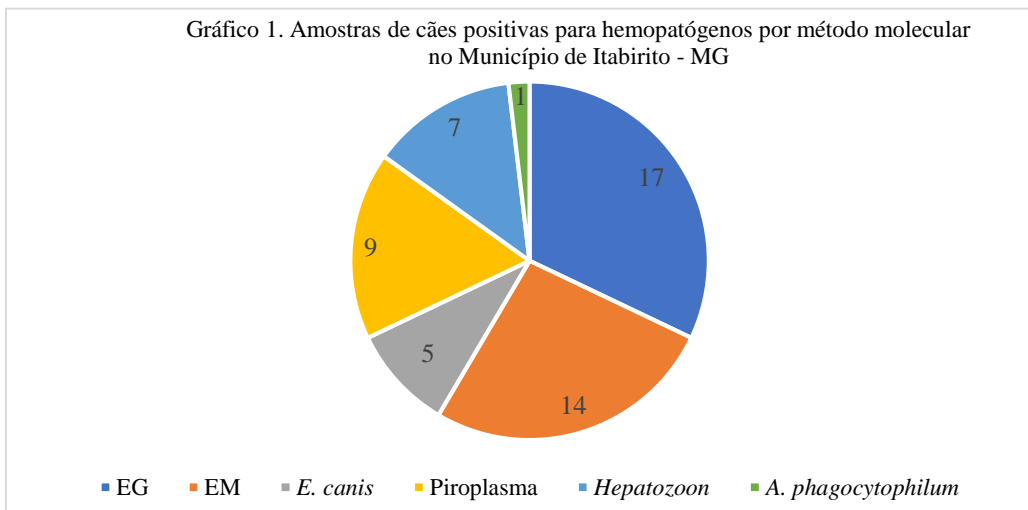


Figura 2. Géis de agarose a 1% corados com GelRed™ demonstrando a amplificação de algumas amostras enviadas para sequenciamento utilizando os iniciadores para espécies granulocíticas e de plaquetas da família Anaplasmataceae (A), Piroplasmas (B) e *Hepatozoon* spp. (C). Na primeira coluna de todos os géis observa-se o padrão molecular (1Kb) e na segunda coluna o controle positivo de cada reação (C+). Fonte: Arquivo Pessoal.



### 3.2 Diagnóstico sorológico

Em relação à pesquisa indireta para *E. canis*, das 100 amostras investigadas, 19 foram reagentes, representando 35% (7/20) dentro o grupo de animais resgatados, 22,22% (2/9) dentre os animais castrados e 14% (10/71) dentre os cães provenientes do bairro Portões. Dos sete cães reagentes dentre o grupo dos resgatados, identificou-se que um cão era de área rural. Dos 19 cães reagentes, 15,79% (3/19) tiveram o diagnóstico confirmado para *Ehlichia* spp. por PCR e/ou nPCR.

Utilizando-se o antígeno de *A. phagocytophilum* na RIFI, foram identificados seis cães reagentes ao se testar as 100 amostras desse estudo, sendo três amostras originadas de cães resgatados e outras três de cães do bairro Portões. Dentre os cães de resgate, um deles, reagente na diluição 1:40, era de região rural e os outros dois, de localização desconhecida, se mostraram reagentes até a diluição 1:80. Considerando as três amostras do bairro Portões, dois cães reagiram até a diluição de 1:160 e um cão até a diluição 1:320. Ao associar a sorologia com os resultados moleculares, observou-se que a única amostra amplificada na nPCR de *A. phagocytophilum* não foi reagente na RIFI para este agente. A distribuição de amostras reagentes para *E. canis*, *A. phagocytophilum* e coinfeções podem ser analisadas no quadro 4. O quadro 5 demonstra os resultados da RIFI para *E. canis* comparados com os resultados da PCR para este mesmo agente. As figuras 3A e 3B se referem a resultados de amostras reagentes para *E. canis* e *A. phagocytophilum*, em lâminas de RIFI cujos antígenos foram obtidos de cultivo dos agentes em células IDE8. Já a figura 3C representa uma reação negativa, em que se observam células IDE8 sem fluorescência.

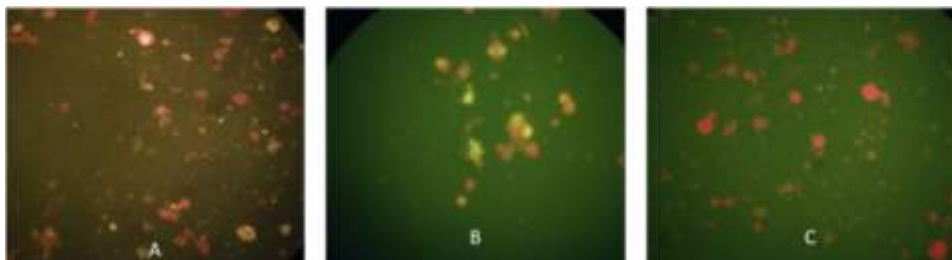


Figura 3 – RIFIs utilizando plasma de cão. Reação positiva para inclusões de *E. canis* (A). Reação positiva para inclusões de *A. phagocytophilum* (B). Reação negativa, demonstrando somente as células IDE8 (C).  
Fonte: Arquivo Pessoal.

Quadro 4. Amostras reagentes em RIFI para *A. phagocytophilum* e *E. canis*, suas diluições e proveniência das amostras.

RIFI/ Local de coleta	Resgatados (n=20)	Castração (n=9)	Portões (n=71)	Total
<i>E. canis</i> *	6	2	9	17
<i>A. phagocytophilum</i> **	1 (1:40); 1 (1:80)	0	2 (1:160)	4
<i>A. phagocytophilum</i> ** correagente com <i>E. canis</i>	1 (1:80)	0	1 (1:320)	2

\* As diluições para *E. canis* foram de 1:40  
 \*\*As diluições para *A. phagocytophilum* estão representadas entre parênteses.

Quadro 5. Comparação entre os resultados dos cães utilizando exame sorológico por RIFI de *E. canis* e nPCR para membros da família Anaplasmataceae que infectam células monocíticas.

	RIFI ( <i>E. canis</i> )		Total de Amostras
	+	-	
PCR ( <i>E. canis</i> – gene <i>dsb</i> )			
+	2	3	5
-	17	78	95
Total de amostras	19	81	100

#### 4. Discussão

A análise molecular por meio do sequenciamento genético das amostras demonstrou que há circulação, nos cães de Itabirito, dos patógenos das espécies *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* e *H. canis*, sendo confirmado mais um local com a presença desses hemopatógenos, melhorando o entendimento da distribuição desses organismos na região sudeste do país. Outros trabalhos demonstram a circulação e dispersão de diferentes espécies de hemopatógenos por todo o país, provavelmente seguindo a disponibilidade abundante de carrapatos capazes de transmitir esses organismos. Moraes *et al.* (2015) demonstraram a circulação de *B. vogeli* em cães no norte do Brasil; Araújo *et al.* (2015) detectaram, por métodos moleculares, *B. vogeli* na região nordeste do Brasil; Spolidorio *et al.* (2011) relataram *B. vogeli* e *H. canis* em Cuiabá, na região centro-oeste brasileira. Sousa *et al.* (2013) demonstraram cães sorologicamente e molecularmente positivos para *B. vogeli*, *E. canis* e *A. platys* na região do centro-oeste brasileiro no estado do Mato Grosso do Sul. No Rio Grande do Sul, Ramos *et al.* (2015) não encontraram cães com *E. canis* por meio de diagnóstico molecular e a maior parte dos animais com diagnóstico de hemopatógenos estavam infectados com *R. vitalli* e *B. vogeli* (54,54% e 27,27% em relação aos cães positivos, respectivamente), demonstrando características epidemiológicas distintas da região de Itabirito, com uma prevalência considerável de cães com *R. vitalli*, fator não encontrado em outras regiões geográficas do Brasil (França *et al.*, 2010).

No estado de Minas Gerais, vários autores reportaram cães infectados por hemopatógenos: Mundim *et al.* (1992) relataram cães com gametócitos sugestivos de *Hepatozoon* em lâminas em Uberlândia; Passos *et al.* (2005) demonstraram por sequenciamento genético a circulação de *B. vogeli* em dois cães da região central e um da região sul do estado; Costa-Junior *et al.* (2007) demonstrou, por métodos sorológicos, cães reagentes para *E. canis* em três áreas de Minas Gerais; Costa-Júnior *et al.* (2013) relataram ainda a presença de *A. platys* em três regiões deste estado. As amostras amplificadas pelos iniciadores para as espécies monocíticas da família Anaplasmataceae (EM), ao serem submetidas a reação com os iniciadores para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp, não foram totalmente confirmadas (5/14). Isso pode ter ocorrido devido às características da PCR realizada com os iniciadores para *dsb*, considerado como um gene

conservado com um limite de detecção, para agentes do gênero *Ehrlichia*, de 50 cópias por reação pelos autores que desenharam esses iniciadores (Doyle *et al.*, 2005). A *nPCR* utilizada inicialmente nesta pesquisa pode apresentar maior sensibilidade comparada com a reação de PCR para *dsb* pelo fato de executar duas reações de PCR, a primeira com iniciadores mais externos e a segunda com iniciadores mais internos. Infelizmente, Kawahara *et al.* (2009), não relataram os limites de detecção para confirmar esta hipótese.

O sequenciamento das amostras amplificadas pelo gene *dsb* alinharam com *E. canis*. Este é o principal agente causador de erliquiose canina no Brasil, com distribuição já conhecida em todo o país (Costa-junior *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2017). Assim, os resultados encontrados no presente estudo confirmam a presença deste patógeno em mais uma região do estado de Minas Gerais, por métodos moleculares. Dagnone *et al.* (2009) reportaram 90,2% de amostras sanguíneas de cães positivos para agentes da família Anaplasmataceae de cães de Campo Grande e Jaboticabal. Essa alta prevalência pode ter ocorrido devido as amostras serem provenientes de cães com inclusões em esfregaço sanguíneo previamente selecionados. Na *nPCR* esses pesquisadores encontraram 40% de cães de Jaboticabal e 18,2% de Campo Grande com *E. canis*. Diferentemente do que ocorreu com o estudo em Itabirito, esses autores não conseguiram encontrar evidências de outros agentes da família Anaplasmataceae em sua amostragem. Sousa *et al.* (2013) obtiveram amostras positivas na *nPCR* para *E. canis* em 45% dos cães em uma área do estado do Mato Grosso do Sul. A prevalência acentuadamente maior de cães positivos para *E. canis* em relação às amostras de Itabirito pode ter ocorrido pelo fato de utilizarem na metodologia de extração de DNA de amostras de baço, sabidamente um tecido que favorece o aumento da sensibilidade do diagnóstico molecular de EMC (Harrus *et al.*, 1998a). Quando comparados com resultados em outros estudos que utilizaram o gene *dsb* para identificação de *Ehrlichia* spp., Witter *et al.* (2013) identificaram 23,3% de cães infectados, porém a amostragem neste trabalho foi de cães com sintomatologia sugestiva de doenças hemoparasitárias. Santos (2013) em cães da região do Pantanal (Centro-Oeste) encontrou em cães da área rural 14,4% e 15,6% em cães da área urbana, demonstrando maiores prevalências do que o presente estudo.

Comparando-se os resultados moleculares e sorológicos, em três amostras cujos DNAs foram amplificados e identificados como *E. canis*, não houve reação positiva na RIFI. Sousa *et al.* (2013) encontraram concordância de 100% entre os métodos de diagnóstico *nPCR* e RIFI para *E. canis* divergindo com o encontrado na pesquisa em Itabirito. Isso pode ocorrer quando o diagnóstico molecular, que tem alta sensibilidade para identificar pequenas concentrações de DNA, é realizado anteriormente à soroconversão desencadeada pelo agente (Wen *et al.*, 1997; Nakaghi *et al.*, 2008). Dessa forma, é provável que estes animais estivessem na fase aguda da doença, em início de infecção. Em relação aos cães reagentes para *E. canis*, observou-se que poucos foram diagnosticados simultaneamente por PCR ou *nPCR*. É conhecido que cães podem permanecer sorologicamente positivos por anos pós-exposição a *E. canis* ou por serem carreadores assintomáticos do patógeno ou por permanência de títulos mesmo em casos de cura. Outra situação em que pode ocorrer este perfil são cães em fase crônica da doença. Isso ocorre pois, nessas situações, não haverá rickettsemia em níveis suficientes para detecção direta e, portanto, o exame molecular se apresenta negativo. Isso demonstra a importância do conhecimento da dinâmica de infecção por *E. canis* para a maior confiabilidade do diagnóstico definitivo (Harrus *et al.*, 1998; O'Connor *et al.*, 2006; Nakaghi *et al.*, 2008).

Em relação à origem dos animais reagentes para *E. canis* observou-se que o grupo de cães resgatados apresentou a maior proporção de animais reagentes. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que normalmente o resgate de cães por prefeituras tem como objetivo a retirada de animais sem tutores de áreas urbanas, evitando-se assim acidentes e outros agravos causados por animais errantes (São Paulo, 2009). A permanência desses cães em áreas urbanizadas do município pode ter favorecido o contato com *R. sanguineus*, principal vetor de *E. canis* (Groves *et al.*, 1975; Baneth *et al.*, 2007).

Em relação ao uso da *n*PCR para organismos granulocíticos ou de plaquetas da família Anaplasmataceae (EG), há possibilidade de detecção de uma grande variedade de hemopatógenos, já que foi a técnica usando primers para EG foi desenvolvida para a identificação de rickettsias que apresentam tropismo por células da linhagem granulocítica, algumas com potencial zoonótico (Massung *et al.*, 1998). Sobre os organismos já detectados parasitando cães no Brasil, os iniciadores EG são capazes de amplificar o DNA de *A. platys* (Krause *et al.*, 2016) e *A. phagocytophilum* (Santos *et al.*, 2009). Desta forma, essa *n*PCR possui uma baixa capacidade de diferenciar essas duas espécies, não sendo, portanto, uma ferramenta de diagnóstico definitivo adequada sem o sequenciamento nucleotídico. Neste estudo, o sequenciamento das amostras amplificadas por estes iniciadores foi bem-sucedido para apenas uma amostra, que se mostrou compatível com *A. platys*, um hemoparasito de importante prevalência no Brasil (Lasta *et al.*, 2013). Em relação às outras amostras, não é possível inferir nenhum diagnóstico sem o alinhamento com outras sequências. Portanto, podemos considerar que essas amostras positivas na *n*PCR (EG) são produtos de reação inespecífica, que pode ocorrer em exames moleculares. Embora a PCR apresente uma alta sensibilidade e especificidade, erros podem ocorrer por excesso de alguns reagentes, em especial os iniciadores, contaminação, processo de extração com pouca concentração de DNA e temperatura/ tempo inadequados durante o processo de anelamento. A formação de moléculas estranhas no processo de replicação, podem também interferir nos resultados do produto final amplificado (Wu *et al.*, 1991; Cha e Thilly, 1993; Sharifian, 2010). As falhas nos passos para o sequenciamento também podem ocorrer levando à baixa qualidade da purificação das amostras ou mesmo interferindo na execução da técnica em si.

Utilizando-se a *n*PCR do gene *msp4*, mais específico para detecção de *A. phagocytophilum*, não houve sucesso no sequenciamento nucleotídico da única amostra positiva. O interessante é que essa amostra também apresentou amplificação no gene 16s rRNA utilizando os iniciadores EG. Falhas no sequenciamento podem ter ocorrido devido à baixa concentração de DNA resultante no produto final da PCR.

Já foi descrito diagnóstico molecular e direto, por visualização de mórulas em esfregaço sanguíneo, de coinfeção de um cão com *A. phagocytophilum* e *Ehrlichia* spp. em Belo Horizonte, capital de Minas Gerais (Silveira *et al.*, 2015). Pelo relato tão próximo geograficamente, nova tentativa de diagnóstico utilizando outros genes como o *ankA*, *gltA* e *groEL* pode levar a um diagnóstico preciso em relação a esta amostra, pois esses genes possuem uma alta sensibilidade e especificidade para organismos da família Anaplasmataceae, apresentando um polimorfismo maior entre espécies filogeneticamente próximas dentro desta família (Guillemi *et al.*, 2015). Sem a confirmação definitiva, a detecção neste estudo de um único cão com *A. phagocytophilum* por *n*PCR utilizando iniciadores para o gene *msp4*, pode apenas sugerir uma infecção e circulação deste agente no município de Itabirito, uma vez que a epidemiologia desta rickettsia não está bem estabelecida no Brasil (Santos *et al.*, 2013). A primeira detecção de *A. phagocytophilum* em cães no país foi há pouco tempo, por Santos *et al.* (2011). Este cenário reforça a dificuldade de se afirmar com precisão se esta amostra foi realmente positiva para *A. phagocytophilum* sem o sequenciamento nucleotídico confirmatório. Além disso, os cães que apresentaram reação na RIFI contra o *A. phagocytophilum* não foram positivos na *n*PCR para o gene *msp4* e tiveram titulação máxima de 1:320, não sendo suficiente para evitar que esses resultados sejam de reações cruzadas (Carrade *et al.*, 2009). Uma explicação para cães com títulos sem a detecção na *n*PCR seria um rápido decréscimo de rickettsemia, comum em cães infectados com *A. phagocytophilum* (Solano-Gallego *et al.*, 2006). Porém, o antígeno usado nas lâminas de *A. phagocytophilum* também pode reagir com anticorpos contra agentes do gênero *Anaplasma* e, até mesmo, *E. canis* (Strik *et al.*, 2007), reforçando a possibilidade de reações cruzadas. Visto que houve reação em dois cães para *E. canis* juntos com *A. phagocytophilum*, a possibilidade de que estes cães estejam reagindo devido a anticorpos contra *E. canis* é epidemiologicamente mais significativo. As outras duas amostras que não reagiram contra *E. canis*, podem se tratar de indivíduos sorologicamente responsivos à infecção por *A. platys*. Em resumo, como *E. canis* e *A. platys* são agentes endêmicos

no Brasil (Dantas-Torres 2008a; Vieira *et al.*, 2011), a reação cruzada é a explicação mais coerente para os cães que reagiram na RIFI para *A. phagocytophilum*.

O presente trabalho teve sucesso em detectar por métodos moleculares (PCR e sequenciamento) o parasitismo por *B. vogeli* em cães de Minas Gerais, somando-se a outros autores que encontraram a circulação desta mesma espécie em cães de Minas Gerais e confirmaram por meio de técnicas moleculares de sequenciamento (Passos *et al.*, 2005; Costa-Júnior *et al.*, 2009). Quanto às amostras positivas no PCR que não foram sequenciadas, há grande probabilidade de serem da espécie *B. vogeli*, devido aos outros relatos desse parasito no estado (Passos *et al.*, 2005; Costa-Júnior *et al.*, 2009). Apesar de outras espécies de babesias (*B. canis* e *B. rossi*) também serem amplificadas pelos iniciadores usados (Piro A/ Piro B) (Carret *et al.*, 1999), epidemiologicamente é improvável que haja circulação desses agentes na população de cães dessa região (Dantas-Torres e Figueredo, 2006). Não foi possível realizar um teste sorológico para *B. vogeli*, o que poderia aumentar a proporção de cães apresentando indícios de contato com o agente, já que cães cronicamente infectados poderiam se apresentar negativos nos testes moleculares e positivos nos testes sorológicos (Vargas-Hernández *et al.*, 2012). Outro questionamento seria a possibilidade de presença de *R. vitalli* dentre as amostras positivas no PCR com Piro A/ Piro B, uma vez que esses iniciadores também amplificam amostras infectadas com este parasito (Lemos *et al.*, 2012). Essa hipótese poderia ser sustentada e deve ser investigada, pois houve a identificação de carrapatos *A. aureolatum*, vetor de *R. vitalli* (Soares *et al.*, 2018), em cães da área rural e periurbana de Itabirito (dados no capítulo 1).

O DNA de *Hepatozoon* foi amplificado em amostras de cães da área periurbana e rural, o que confirma os achados de outros estudos que encontraram cães infectados em regiões semelhantes, sendo uma infecção de maior prevalência em áreas com menor grau de urbanização (O'Dwyer *et al.*, 2001; O'Dwyer *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2014). Porém, não podemos afirmar que não possa haver circulação deste agente em cães da área urbana de Itabirito, pois, em outros trabalhos, *Hepatozoon* spp. foi detectado neste ambiente (Paludo *et al.*, 2003; O'Dwyer *et al.*, 2006; Spolidorio *et al.*, 2011). Devido à baixa amostragem de cães provenientes de áreas urbanizadas do município, a investigação de *Hepatozoon* spp. nestas regiões pode ter sido prejudicada. Levando em consideração que os iniciadores utilizados possuem maior especificidade para o gênero *Hepatozoon* (Criado-Fornelio *et al.*, 2006) foi enviado somente uma amostra para o sequenciamento, demonstrando similaridade com *H. canis*. Este resultado era esperado, pois o agente em circulação em cães no Brasil é provavelmente desta espécie (Rubini *et al.*, 2005). Ramos *et al.* (2015) relatou na região Centro-Oeste do Brasil, por meio de diagnóstico molecular, 3,63% de cães com *Hepatozoon*. Esse achado teve menor prevalência em relação aos animais de Itabirito, que mesmo representando uma amostra sem viés de seleção, foi encontrado 7% de positivas por meio da mesma metodologia de diagnóstico. No Rio Grande do Sul, Malheiros *et al.* (2016) reportaram a presença de *H. canis* utilizando o diagnóstico molecular em apenas 1,25% dos cães analisados com sintomatologia clínica, apresentando menor prevalência. Spolidorio *et al.* (2009), utilizando os mesmos iniciadores, encontraram maior prevalência de cães com *H. canis* no Espírito Santo (58,7%) utilizando amostras de várias partes desse Estado. Nesse trabalho, foi interessante notar que grande parte dos animais eram assintomáticos, indicando que esse patógeno apresenta baixa virulência.

No presente estudo, foram encontrados cães coinfectados por *E. canis* e um Piroplasma; *H. canis* e *E. canis*; e *H. canis* e um Piroplasma. A detecção de coinfeções por diferentes agentes em exames moleculares pode ser explicada por possuírem um vetor comum capaz de infectar-se com dois ou mais patógenos ao mesmo tempo transmitindo-os ao hospedeiro vertebrado (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Outros autores já relataram coinfeções em cães por mais de um hemopatógeno. Mundim *et al.* (1992) relataram infecção em um mesmo animal por *H. canis* e *E. canis*; Malheiros *et al.* (2016) encontraram cães sorologicamente positivos para *B. vogeli* e *E. canis*; Ramos *et al.*, (2010) relataram coinfeções detectadas em exames moleculares em cães na cidade de Recife por *E. canis* e *A. platys*, *E. canis* e *B. vogeli*, *A. platys* e *B. vogeli*, *A. platys* e *M. haemocanis* e infecção com até com três agentes, sendo *A. platys*, *B. vogeli* e *E. canis*, além de *A.*

*platys*, *E. canis* e *H. canis*. Outro estudo também reportou a associação de três patógenos *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. (Sasanelli *et al.*, 2009)

A detecção do DNA dos hemopatógenos dos cães de áreas periurbana ou rural e dos animais resgatados, cujas localizações são indefinidas, pode ter ocorrido devido a esses animais possuírem maior contato com carrapatos, o que acarreta em reinfecções recorrentes, pelo menos para os animais infectados com rickettsias (Neer *et al.*, 2002). Quanto à infecção por *B. vogeli*, esta hipótese de reinfecção não se aplica, pois cães em estado de portadores apresentam imunidade protetiva e a parasitemia costuma ser baixa, podendo não ser detectada por PCR (Brandão *et al.*, 2003). A amplificação de DNA no grupo de cães citados, pode indicar também recidivas devido a estresse nutricional ou físico, que diminui a capacidade de controle de parasitemia (Otranto *et al.*, 2009). Outra hipótese pode estar relacionada ao tamanho amostral, já que cães da castração foram somente 9% comparado ao restante da amostragem. O que sustenta esta última afirmação é o fato de o exame sorológico dos cães de área urbana demonstrar uma exposição prévia a *E. canis* e ter sido encontrado parasitismo nesses animais por *R. sanguineus* s.l. (dados no capítulo 1).

## 5. Conclusões

- Foi identificado as espécies de hemopatógenos *B. vogeli*, *H. canis*, *E. canis* e *A. platys* em cães no município de Itabirito, na região central do estado de Minas Gerais, dados de acordo com outros trabalhos da literatura;
- Nas amostras coletadas neste estudo, não foi possível determinar a presença de *E. ewingii* ou *E. chaffeensis* parasitando cães;
- A biologia molecular é uma metodologia muito útil para o diagnóstico de hemopatógenos. Porém, deve-se conhecer as peculiaridades de cada agente para interpretar os resultados fornecidos por esta técnica;
- Em fases de provável baixa rickettsemia para *E. canis*, foi possível demonstrar neste estudo que mesmo cães negativos em técnicas moleculares, podem apresentar reação sorológica por imunofluorescência indireta, indicando exposição ou fase subclínica de erliquiose;
- A sorologia demonstrou contato dos cães com hemoparasitos. Porém, a possibilidade de reações cruzadas faz com que esta técnica seja interpretada com dados epidemiológicos. Com isso, concluímos que utilizando o método sorológico a *E. canis* circula em todas as regiões avaliadas no estudo, porém a sorologia reativa para *A. phagocytophilum*, pode tratar-se de reações cruzadas com *A. platys*, principalmente.
- Considerando as condições do experimento, não se pode excluir a circulação de *R. vitalli* nem de *A. phagocytophilum* entre os cães da área estudada;
- Futuros estudos com maior número de cães da zona urbana da cidade são necessários para dados epidemiológicos precisos de prevalência entre os patógenos identificados.
- Estudos com outras espécies animais, poderiam auxiliar na detecção de *A. phagocytophilum* na região.

## 6. Considerações finais

Os métodos moleculares confirmaram a circulação de hemopatógenos transmitidos por carrapatos das espécies *B. vogeli*, *H. canis*, *E. canis* e *A. platys* encontrados, todos estes comumente associados a endemicidade em várias regiões do país. Este fato pode estar associado, possivelmente, ao vetor, *R. sanguineus*, o principal encontrado em cães nesta pesquisa. Como não se confirma na literatura a transmissão pelo *R. sanguineus* de *H. canis*, no Brasil, outras rotas

epidemiológicas podem estar ocorrendo neste município. Este seria um campo interessante para pesquisas futuras.

Patógenos transmitidos por carrapatos do gênero *Amblyomma* para cães, como no caso da *Rangelia vitali*, não foram confirmados neste estudo. Portanto, novos estudos sobre a presença deste patógeno seriam necessários, visto que há o contato dos cães com ambientes silvestres e rurais, além do parasitismo por *A. aureolatum* encontrado em fase parasitária nos cães. Como este trabalho não foi conclusivo a respeito deste hemoparasito, novas abordagens metodológicas poderiam ser otimizadas para a detecção deste patógeno de alta virulência para cães.

A circulação de *A. phagocytophilum* foi também inconclusivo. Assim, estudos a respeito desta rickettsia no município seriam muito importantes, visto que este patógeno tem alto potencial zoonótico. A pesquisa de carrapatos e hemopatógenos em outros animais, domésticos e selvagens, poderia ajudar a elucidar este impasse.

O hábito avaliado na maioria dos cães permite concluir que há facilidade de trânsito de carrapatos entre eles. O contato desses hospedeiros com áreas de mata, bem como seu contato próximo com as populações humanas, permite concluir que o trânsito de carrapatos infectados por diferentes hemopatógenos transmitidos por ele é possível, expondo a população do município e outros animais ao risco. A presença de carrapatos que podem parasitar humanos (*A. aureolatum* e *A. sculptum*) e conhecidamente são vetores de *R. rickettsi* levanta a questão da presença deste hemoparasito não estudado, no presente trabalho. Futuras investigações sobre esta rickettsia poderia ser de extrema importância para a saúde pública e animal.

## Referências Bibliográficas

- ABEYGUNAWARDENA, I.; KAKOMA, I.; SMITH, R. D. Pathophysiology of Canine Ehrlichiosis. In: WILLIAMS, J. C.; KAKOMA, I. (Org.). *Ehrlichiosis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990. p. 78–92. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-94-009-1998-37>>. Acesso em: 06 jan. 2019.
- ACOSTA, I. C. L.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A. *et al.* Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from humans, domestic and wild animals in the state of Espírito Santo, Brazil, with notes on rickettsial infection. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 3–4, p. 66–69, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.08.001>>. Acesso em: 27 nov. 2018.
- ADAMU, M.; TROSKIE, M.; OSHADU, D. O. *et al.* Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.
- AGUIAR, D. M.; TAÍS, I.; SAITO II, B. *et al.* Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. *Ciência Rural*, v. 37337, n. 3, p. 796802, 2007a.
- AGUIAR, D. M.; RIBEIRO, M. G.; SILVA, W. B. *et al.* Hepatozoonose canina: Achados clínico-epidemiológicos em três casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 3, p. 411–413, 2004.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A. *et al.* Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of medical entomology*, v. 44, n. 1, p. 126–132, 2007b.
- AKTAS, M.; OZUBEK, S. Molecular evidence for trans-stadial transmission of *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 32, n. 1, p. 78–83, 14 mar. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mve.12261>>.
- ALLRED, D. R. Babesiosis: Persistence in the face of adversity. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 2, p. 51–55, 2003.
- ALMEIDA, A. D. B. P. F.; PAULA, D. A. J.; DAHROUG, M. A. A. *et al.* *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 3, p. 1123–1126, 2012.
- ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. (Org.). *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. 1. ed. Rio de Janeiro: LF Livros, 2002. p. 13–56.
- ALVES, A. J. S.; GUILLOUX, A. G. A.; ZETUN, C. B. *et al.* Abandono de cães na América Latina : revisão de literatura. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 11, n. 2, p. 34–41, 2013.
- ALVES, T. B.; FAGGION, S. A.; SANTOS, E. V. *et al.* Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil Estudio de micoplasmas hemotróficos en perros de Ribeirão Preto , Brasil , basado en la PCR en tiempo real. *Arch Med Vet*, v. 336, p. 333–336, 2014.
- AMARAL, M. A. Z. DO; ROCHA, C. M. B. M. DA; FACCINI, J. L. *et al.* Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 2, p. 148–154, 2011.
- AMORIM, L. S.; WENCESLAU, A. A.; CARVALHO, F. S. *et al.* Bovine babesiosis and anaplasmosis complex:

diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 3, p. 328–336, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612014000300328&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000300328&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 04 jan. 2019.

ARAES-SANTOS, A. I.; MORAES-FILHO, J.; PEIXOTO, R. M. *et al.* Ectoparasite Infestations and Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 15, n. 11, p. 645–651, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2015.1786>>. Acesso em: 29 de nov. 2018.

ARAGAO, H. B.; FONSECA, F. *Notas De Ixodologia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* [S.l: s.n.], 1953a

ARAGAO, H. B.; FONSECA, F. *Notas de Ixodologia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* [S.l: s.n.], 1953b

ARAGÃO, H. B. *Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* [S.l: s.n.], 1936

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. *Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* [S.l: s.n.], 1961a.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. *Notas de Ixodologia. IX. O complexo Ovale do genero Amblyomma. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* [S.l: s.n.], 1961b.

ARAUJO, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; AZEVEDO, S. S. *et al.* *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 456–461, 2015.

ARRAGA-ALVARADO, C. M.; QUROLLO, B. A.; PARRA, O. C. *et al.* Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, n. 6, p. 1161–1165, 2014.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 2, p. 179–186, 1998.

BALCH, A.; MACKIN, A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: Pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compendium (Yardley, PA)*, p. 217–225, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10595753>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

BANETH, G. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 254, n. March, p. 58–63, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.001>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

BANETH, G.; SHKAP, V.; PRESENTEY, B. Z. *et al.* *Hepatozoon canis*: The prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Veterinary Research Communications*, 1996.

BANETH, G.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; CARDOSO, L. *et al.* Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2015.

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life Cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the Tick *Rhipicephalus sanguineus* and Domestic Dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology*, v. 93, n. 2, p. 283–299, 2007. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-494R.1>>. 05 fev. 2019.

BAQUERO, O. S.; CHIOZZOTTO, E. N.; GARCIA, R. DE C. M. *et al.* Abandonment of Dogs and Cats: Public Opinions as Population Management Indicators. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 20, n. 3, p. 289–295, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10888705.2017.1317251>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

BARBIERI, A. R. M.; FILHO, J. M.; NIERI-BASTOS, F. A. *et al.* Epidemiology of Rickettsia sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 6, 2014.

BARBIERI, J. M.; ROCHA, C. M. B. M. D.; BRUHN, F. R. P. *et al.* Altitudinal Assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), Vectors of Spotted Fever Group Rickettsiosis in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 5, p. 1170–1174, 2015.

BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. DA S.; MAGALHÃES, D. F. DE. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. *Ciênc. vet. trop.*, v. 14, n. 1/2/3, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<http://www.revvt.org.br/volume14/Volume142011de1a9ZOOSESES.pdf>>. Acesso em: 02 dez 2018.

BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. v. 7, n. 4, p. 271–274, 1996.

BASTOS, A. L. F. *Estudo Da Dinâmica Populacional E Das Estratégias De Manejo Da População Canina No Município De Itabirito, Mg, Brasil De 2007 a 2011.* 2013. 142 f. Tese. UFMG, 2013.

BASTOS, C. DE V. E.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1026, p. 158–160, 2004.

BEAUFILS, J. P.; INOKUMA, H.; MARTIN-GRANEL, J. *et al.* *Anaplasma platys* (Ehrlichia platys) infection in a dog in France : description of the case, and characterization of the agent. *Revue Méd Vét.*, v. 153, n. 2, p. 85–90, 2002.

BECK, A. M. Dogs, zoonoses and public health. In: MACPHERSON, C. N. L.; MESLIN, F. X.; WANDELER, A. I. (Org.). *The human-dog relationship: a tale of two species.* Wallingford: CABI, 2000. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20003033827>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

BECK, R.; VOJTA, L.; MRLJAK, V. *et al.* Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 7, p. 843–848, 2009.

BEUGNET, F.; MARIÉ, J. L. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*, v. 163, n. 4, p. 298–305, 2009.

BICALHO, K. A.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n. 5, 2002.

BIRKENHEUER, A. J. Babesiosis. In: GREENE, C. E. (Org.). *Infectious diseases of the dog and cat.* 4<sup>a</sup> ed. St. Louis: Elsevier, 2013. p. 771–784.

BIRKENHEUER, A. J.; NEEL, J.; RUSLANDER, D. *et al.* Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, v. 124, n. 3–4, p. 151–160, 2004.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (asian Gegotype). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.

BITTENCOURT, A.; FONSECA, A. H.; FACCINI, J. L. *et al.* Comportamento do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari) em infestações artificiais e naturais em diferentes hospedeiros. *Arquivo Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 13, n. 2, p. 173–182, 1990.

BOOL, P. H. Studies on *Ehrlichia canis* (syn. *Rickettsia canis*). *Acta Tropica*, v. 16, n. 2, p. 97–107, 1959. Disponível em: <<http://doi.org/10.5169/seals-310807>>. Acesso em: 12 jan 2019.

BOWN, K. J.; LAMBIN, X.; OGDEN, N. H. *et al.* High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 1771–1776, 2007.

BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K.; MYIASHIRO, S. I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Veterinary Parasitology*, v. 114, n. 4, p. 253–265, 2003.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J. J.; WAGNER, E. R. *et al.* Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v. 131, n. 1–2, p. 95–105, 2005.

BROWN, G. K.; CANFIELD, P. J.; DUNSTAN, R. H. *et al.* Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis* free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 84, n. 9, p. 321–325, 2006.

BUHLES, J. W. C.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K. Tropical Canine Pancytopenia: Role of Aplastic Anaemia In the Pathogenesis of Severe Disease. *J. Comp. Path.*, v. 85, p. 511–521, 1975.

BUORO, I. B. J.; KANUI, T. I.; ATWELL, R. B. *et al.* Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 31, n. 12, p. 624–627, 1990.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R. S.; SZABÓ, M. P. J. *et al.* Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: Is there a geographical pattern? *Experimental and Applied Acarology*, v. 50, n. 4, p. 361–374, 2010.

CACCIÒ, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A. *et al.* Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 106, n. 4, p. 285–292, 2002.

CARDOZO, G. P.; OLIVEIRA, L. P.; ZISSOU, V. G. *et al.* Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 478–479, 2007.

CARLI, E.; TASCA, S.; TROTTA, M. *et al.* Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Veterinary Parasitology*, v. 162, n. 1–2, p. 51–57, 2009.

CARMO, G. M.; CRIVELLENTI, L. Z.; BOTTARI, N. B. *et al.* Butyrylcholinesterase as a marker of inflammation and liver injury in the acute and subclinical phases of canine ehrlichiosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 43, p. 16–21, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.09.005>>. Acesso em: 28 jan 2019.

CARRADE, D. D.; FOLEY, J. E.; BORJESSON, D. L. *et al.* Canine granulocytic anaplasmosis: a review. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 6, p. 1129–1141, 2009.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B. *et al.* *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: Differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v. 46, n. 3, p. 298–303, 1999.

CHA, R. S.; THILLY, W. G. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Manual Supplement*, p. 18–29, 1993.

CHANG, W.-L.; SU, W.-L.; PAN, M.-J. Two-Step PCR in the Evaluation of Antibiotic Treatment for *Ehrlichia platys* Infection. *J. Vet. Med. Sci*, v. 59, n. 9, p. 849–851, 1997.

CHAO, L. L.; LIAO, H. T.; HO, T. Y. *et al.* First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Acta Tropica*, v. 166, p. 356–362, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.022>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S. *et al.* *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, 2009.

CODNER, E. C.; ROBERTS, R. E.; AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*, 1985.

COLES, T. B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

COSTA-JUNIOR, L. M.; REMBECK, K.; MENDONÇA, F. L. D. M. *et al.* Occurrence of ectoparasites on dogs in rural regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 21, n. 3, p. 237–242, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070433>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K. *et al.* 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*, v. 86, n. 2, p. 257–260, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.07.002>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L. M. F. *et al.* Factors associated with epidemiology of *Anaplasma*

*platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 109, n. 3–4, p. 321–326, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

COSTA JUNIOR, L. M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M. F. B. *et al.* Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *Veterinary Journal*, v. 174, n. 3, p. 673–676, 2007.

CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J. L.; CASADO, N. *et al.* New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology*, v. 92, n. 1, p. 93–99, 2006. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-464R.1>>. Acesso em: 03 fev. 2019.

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I. D.; ANDRÉ, M. R. *et al.* Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 4, p. 20–25, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, v. 3, p. 26, 2010.

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

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M.; ANNOSCIA, G. *et al.* Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 213, 2013. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-213>>.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 3–4, p. 173–185, 2008b.

DANTAS-TORRES, F. Ticks on domestic animals in Pernambuco, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 03, p. 22–28, 2009. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbpv.01803004>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 10, p. 437–446, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

DANTAS-TORRES, F. D.; MELO, M. F.; FIGUEREDO, L. A. *et al.* Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 03, p. 75–77, 2009. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbpv.01803014>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, v. 141, n. 3–4, p. 197–203, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 1, p. 64–67, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary Parasitology*, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

DAWSON, J. E.; RIKIHISA, Y.; EWING, S. A. *et al.* Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *Journal of Infectious Diseases*, v. 163, n. 3, p. 564–567, 1991.

DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V. *et al.* Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*, v. 2, p. 1–5, 2006.

DE LA FUENTE, J.; MASSUNG, R. F.; WONG, S. J. *et al.* Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 1309–1317, 2005.

DEMONER, L. D. C.; ANTUNES, J. M. A. DE P.; O'DWYER, L. H. Hepatozoonose canina no brasil: aspectos da biologia e transmissão. *Veterinaria e zootecnia*, v. 20, n. 2, p. 193–202, 2013.

DEMONER, L. D. C.; RUBINI, A. S.; DOS SANTOS PADUAN, K. *et al.* Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 4, n. 6, p. 542–546, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.006>>. Acesso em: 09 fev. 2019.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 7, n. 4, p. 504–510, 2005.

DUARTE, S. C.; CRISTINA, C.; LOULY, B. *et al.* Diagnóstico parasitológico e molecular da babesiose canina na cidade de Goiânia-Go. *Revista De Patologia Tropical*, v. 37, n. 3, p. 229–236, 2008.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BAKKER, C. P. *et al.* Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 2001, p. 2145–2165, 2001.

EDDLESLONE, S. M.; NEER, T. M.; GAUNT, S. D. *et al.* Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, n. 4, p. 840–844, 2006.

EDDLESTONE, S. M.; DINIZ, P. P. V. P.; NEER, T. M. *et al.* Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J Vet Intern Med*, v. 21, n. 1, p. 1237–1242, 2007.

EDLOW, J. A.; MCGILLICUDDY, D. C. Tick Paralysis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 22, n. 3, p. 397–413, set. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552008000202>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

EIRAS, D. F.; BASABE, J.; MESPLET, M. *et al.* First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 157, n. 3–4, p. 294–298, 2008.

ELSHEIKHA, H. M. Tick-borne Diseases. In: ELSHEIKHA, H. M.; KHAN, N. A. (Org.). *Essentials of Veterinary Parasitology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. p. 133–138.

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

ESTRADA-PENA, A.; ASCHER, F. Comparison of an amitraz-impregnated collar with topical administration of fipronil for prevention of experimental and natural infestations by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *J Am Vet Med Assoc*, 1999.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. DE P. E. S.; SILVA, J. R. V. DA *et al.* Efeitos toxicológicos e ineficiência in vitro de deltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus*, de Goiânia, Goiás, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, p. 159–165, 2001.

FERREIRA, B. R.; SZABÓ, M. J. .; CAVASSANI, K. A. *et al.* Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Veterinary Parasitology*, v. 115, n. 1, p. 35–48, 10 jul. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703001900?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 out. 2018.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- $\gamma$ -induced macrophage microbicidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.

FERREIRA, R. F.; MELLO, A. DE; CERQUEIRA, F. *et al.* *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 5, n. 3, p. 113–119, 2007.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; KOMMERS, G. G. *et al.* Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 11, p. 974–987, 2010.

FONSECA, J. P.; BRUHN, F. R. P.; RIBEIRO, M. J. M. *et al.* Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2017.

FONTALVO, M. C.; BRAGA, I. A.; AGUIAR, D. M. *et al.* Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* in cats. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 17, n. 3, p. 418–424, 2016.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C. *et al.* Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 134, n. 1–2, p. 1–7, 2005.

FOURIE, J. J.; STANNECK, D.; LUUS, H. G. *et al.* Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary Parasitology*, 2013.

FRAGA, E.; BARREIRO, J. D.; GOICOA, A. *et al.* Abdominal ultrasonographic findings in dogs naturally infected with babesiosis. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 2011.

FRANÇA, R. T.; DA SILVA, A. S.; LORETTI, A. P. *et al.* Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day - A review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 5, p. 466–474, 2014.

FRANÇA, R. T.; DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M. *et al.* Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 42, n. 1, p. 31–39, 2013.

FRANÇA, R. T.; DA SILVA, A. S.; PAIM, F. C. *et al.* *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comparative Clinical Pathology*, v. 19, n. 4, p. 383–387, 2010.

FRANQUE, M. P.; SANTOS, H. A.; SILVA, G. V. O. DA *et al.* Características biológicas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) a partir de infestação experimental em cão. *Rev. Bras. Para.*, v. 16, n. 4, p. 238–242, 2007.

FUKUMOTO, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I. *et al.* Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International Journal for Parasitology*, 2005.

GAL, A.; HARRUS, S.; ARCOH, I. *et al.* Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Canadian Veterinary Journal*, v. 48, n. 6, p. 619–622, 2007.

GARCIA, M. V.; SILVA, D. C. DA; ALMEIDA, R. F. C. DE *et al.* Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 22, n. 1, p. 124–128, 2013.

GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B. *et al.* Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & vectors*, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.

GIANNELLI, A.; RAMOS, R. A. N.; DI PAOLA, G. *et al.* Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v. 196, n. 1–2, p. 1–5, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.017>>. Acesso em: 08 fev. 2019.

GILOT, B.; LAFORGE, M. L.; PICHOT, J. *et al.* Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and mediterranean spotted fever epidemiology in France. v. 6, n. 4, p. 357–362, 1990.

GODDARD, J. Focus of Human Parasitism by the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 26, n. 6, p. 628–631, 1989.

GOMES, P. V.; MUNDIM, M. J. S.; MUNDIM, A. V. *et al.* Occurrence of *Hepatozoon* sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 174, n. 1–2, p. 155–161, 2010.

GONZÁLEZ, A.; CASTRO, D. D. C.; GONZÁLEZ, S. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v. 120, n. 1–2, p. 123–129, 2004.

GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M. R.; SOARES, J. F. *et al.* *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo

Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 25, n. 2, p. 172–178, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612016000200172&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000200172&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 02 fev. 2019.

GRAY, J. S.; DAUTEL, H.; ESTRADA-PEÑA, A. *et al.* Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, p. 1–12, 2009. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/593232/>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L. *et al.* Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, 1975.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J. *et al.* *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): Hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 3–4, p. 273–288, 2003.

GUILLEMI, E. C.; TOMASSONE, L.; FARBER, M. D. Tick-borne Rickettsiales: Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, v. 119, p. 87–97, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.009>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

GUIMARÃES, A. M. ; OLIVEIRA, T. M. F. S. ; SANTA ROSA, I. C. A. Babesiose canina : uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. *Revista Clínica Veterinária*, v. 41, n. November, p. 60–68, 2002.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I. *et al.* Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 73–76, 1998a.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E. *et al.* Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Veterinary Record*, v. 141, n. 14, p. 360–363, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A. *et al.* Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 62, n. 1, p. 15–27, 1998b.

HARRUS, S.; WANER, T.; WEISS, D. J. *et al.* Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 51, n. 1–2, p. 13–20, 1996.

HARRUS, S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Journal*, v. 204, n. 3, p. 239–240, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.027>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. *et al.* Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 9, p. 2745–2749, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. *Ehrlichia* and *Anaplasma* infectious. In: GREENE, C. E. (Org.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4 ed. [S.l: s.n.], 2012. p. 227–257.

HARTELT, K.; RIEKER, T.; OEHME, R. M. *et al.* First Evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in Dogs in Western Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 7, n. 2, p. 163–166, 2007. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2006.0580>>.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *Journal of Infectious Diseases*, v. 137, n. 2, p. 182–188, 1978.

HATTA, T.; MATSUBAYASHI, M.; MIYOSHI, T. *et al.* Quantitative PCR-Based Parasite Burden Estimation of *Babesia gibsoni* in the Vector Tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae), Fed on an Experimentally Infected Dog. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 75, n. 1, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<http://japanlinkcenter.org/DN/JST.JSTAGE/jvms/12-0175?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

HEIM, A.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. *et al.* Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitology Research*, v. 102, n. 1, p. 63–68, 2007.

HEUKELBACH, J.; FRANK, R.; ARIZA, L. *et al.* High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). *Parasitology Research*, v. 111, n. 5, p. 1913–1921, 2012.

IBGE. *Pesquisa Nacional de Saúde: 2013*. Rio de Janeiro: [s.n.], 2015. p. 26–28. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K. *et al.* Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 110, n. 1–2, p. 145–152, 2002.

INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; MATSUMOTO, K. *et al.* Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 121, n. 3–4, p. 341–346, 2004.

IRWIN, P. J. Canine Babesiosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 40, n. 6, p. 1141–1156, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.08.001>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

ITABIRITO. *Dados Geográficos - Prefeitura Municipal de Itabirito*. Disponível em: <<http://www.itabirito.mg.gov.br/descubra-itabirito/dados-geograficos/>>. Acesso em: 30 out. 2017.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; JARDINE, J. *et al.* Blood, Bull Terriers and Babesiosis: Further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*, v. 85, n. 11, p. 459–463, 2007.

JOHNSON, E. M.; PANCIERA, R. J.; ALLEN, K. E. *et al.* Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, n. 6, p. 1315–1318, 2009.

JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C. *et al.* Ocorrência e caracterização molecular de espécies de Babesia em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 17, n. S1, p. 277–283, 2008.

JONGEJAN, F.; CRAFFORD, D.; ERASMUS, H. *et al.* Comparative efficacy of oral administrated afoxolaner (NexGard™) and fluralaner (Bravecto™) with topically applied permethrin/imidacloprid (Advantix®) against transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. *Parasites and Vectors*, 2016.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v. 129, n. 07, p. S3–S14, 2005. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182004005967](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182004005967)>. Acesso em: 27 jan. 2019.

KADA, S.; MCCOY, K. D.; BOULINIER, T. Impact of life stage-dependent dispersal on the colonization dynamics of host patches by ticks and tick-borne infectious agents. *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

KAGIWARA, M. K.; HOLZCHUH, M. P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*. I- Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 39, p. 745–755, 1987.

KAKOMA, I.; CARSON, C. A.; RISTIC, M. *et al.* Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine Ehrlichiosis. *Infection and Immunity*, v. 20, n. 1, p. 242–247, 1978.

KAWAHARA, M.; TAJIMA, T.; TORII, H. *et al.* *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 12, p. 1991–1993, 2009.

KJEMTRUP, A. M.; THOMFORD, J.; ROBINSON, T. *et al.* Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. *Parasitology*, v. 120, n. 5, p. 487–493, 2000.

KJEMTRUP, A. M.; CONRAD, P. A. Human babesiosis: An emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12–13, p. 1323–1337, 2000.

KLIMPEL, S.; HEUKELBACH, J.; POTHMANN, D. *et al.* Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): High infection risk for humans? *Parasitology Research*, v. 107, n. 3, p. 713–719, 2010.

KRAUSE, L. E. B.; SAMPAIO, L. C. L.; RIBEIRO, C. L. G. *et al.* Molecular characterization of *Anaplasma platys* in dogs in Pelotas city, Southern Brazil. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, v. 3, n. 1, p. 20–25, 2016.

KRAWCZAK, F. D. S.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A. *et al.* Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 4, p. 415–7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184320>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

LABRUNA, M. B.; GERARDI, M.; KRAWCZAK, F. S. *et al.* Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 8, n. 1, p. 146–156, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.10.011>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; GOBESSO, A. A. D. O. *et al.* Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 195–200, 2004.

LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A. *et al.* Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *Journal of medical entomology*, v. 40, n. 2, p. 170–8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12693845>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES, J. S. *et al.* Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 5, p. 553–556, 2001.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C. *et al.* Rickettsia Species Infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 90–98, 2004.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F. *et al.* Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 1, p. 1–14, 2001.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J. *et al.* Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 3, p. 458–460, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2006.0621>>. Acesso em: 28 fev. 2018.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A. *et al.* Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 36, n. 1, p. 149–163, 2005.

LABRUNA, M.; PEREIRA, M. *Carrapato em Cães no Brasil. Clínica Veterinária*. [S.l.: s.n.], 2001

LAKKAWAR, A. W.; NAIR, M. G.; VARSHNEY, K. C. *et al.* Pathology of canine monocytic ehrlichiosis in a German shepherd dog. *Slovenian Veterinary Research*, v. 40, n. 2, p. 119–128, 2003.

LASTA, C. S.; SANTOS, A. P. DOS; MELLO, F. P. DA S. *et al.* *Hepatozoon canis* infection in a domestic dog in Southern Brazil confirmed by molecular techniques. *Ciência Rural*, v. 39, n. 7, p. 2135–2140, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782009000700028&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000700028&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 02 fev. 2019.

LASTA, C. S.; SANTOS, A. P. DOS; MESSICK, J. B. *et al.* Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 3, p. 360–366, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612013000300360&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612013000300360&lng=en&tlng=en)>. acesso em: 28 jan. 2019.

LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; GIANNELLI, A. *et al.* Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 6, p. 943–946, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.014>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

LEAL, P. D. S.; MORAES, M. I. M. R.; BARBOSA, L. L. DE O. *et al.* Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 37, p. 55–62, 2015.

LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P. R.; LOPES, C. M. L. *et al.* Alguns aspectos epidemiológicos das infestações por *Amblyomma cajennense*: uma proposta de controle estratégico. In: VERÍSSIMO, C.J.; AUGUSTO, C. *Simpósio sobre Controle de Parasitos*, 2.: controle de parasitos de equinos. Colina, SP: Instituto de Zootecnia, 1997. p.9-14.

LEMO, T. D.; CERQUEIRA, A. D. M. F.; TOMA, H. K. *et al.* Detection and molecular characterization of piroplasm species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 137–42, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832754>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

LEWIS, G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D. *et al.* The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *American journal of veterinary research*, v. 38, n. 12, p. 1953–5, dez. 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/596693>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

LITTLE, S. E.; HOSTETLER, J.; KOCAN, K. M. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Veterinary Parasitology*, v. 150, n. 1–2, p. 139–145, 2007.

LOBETTI, R.; DVIR, E.; PEARSON, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 16, n. 1, p. 63–68, jan. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2002.tb01607.x>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

LOPES, C. M. L.; OLIVEIRA, P. R.; HADDAD, J. P. *et al.* Biological parameters of ticks (*Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787) under field and laboratory conditions in Pedro Leopoldo, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 17 Suppl 1, p. 14–17, 2008.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 134, n. 3–4, p. 193–213, 2005.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia Vitalli* em cães ("Nambiuú", "Peste De Sangue")- uma revisão crítica sobre o assunto. *Arq. Inst. Biol.*, 2004.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V. F. DE *et al.* Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 1, p. 103–106, 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/381%5Cnhttp://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/381>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

LOW, V. L.; PRAKASH, B. K.; LIM, Y. A. L. *et al.* Detection of Anaplasmataceae agents and co-infection with other tick-borne protozoa in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. *Experimental and Applied Acarology*, n. 0123456789, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10493-018-0280-9>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

LUZ, H. R.; MCINTOSH, D.; FURUSAWA, G. P. *et al.* Infection of *Amblyomma ovale* with *Rickettsia* species Atlantic rainforest in Serra do Mar, São Paulo State, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 6, p. 1265–1267, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.003>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; LANDULFO, G. A. *et al.* New records for *Amblyomma sculptum* (Ixodidae) on non-passerine birds in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 25, n. 1, p. 124–126, 2016.

M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 1–2, p. 1–7, 2008.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M. B.; DAGNONE, A. S. *et al.* Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Veterinary Parasitology*, v. 139, n. 1–3, p. 262–266, 2006.

MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; WERTHER, K. *et al.* Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 12, n. 8, p. 705–708, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2011.0803>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N. *et al.* Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. 2015 ACMT Annual Scientific Meeting, March 27–29, 2015 Clearwater Beach, FL. *Parasit Vectors*, v. 6, n. 1, p. 103, 2013.

MAKINDE, M. O.; BOBADE, P. A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. *Research in Veterinary Science*, v. 57, n. 3, p. 343–348, 1994.

MALHEIROS, J.; COSTA, M. M.; DO AMARAL, R. B. *et al.* Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 5, p. 893–900, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

MARTIN, A. R.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K. *et al.* *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Experimental Parasitology*, 2006.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B. *et al.* Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites and Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

MARTINS, C. M.; BARROS, C. DA C. DE; BIER, D. *et al.* Dog parasite incidence and risk factors, from sampling

after one-year interval, in Pinhais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 101–106, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612012000200006&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612012000200006&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 10 jun. 2019.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, v. 56, n. 2, p. 151–158, 2012.

MAURELLI, M. P.; PEPE, P.; COLOMBO, L. *et al.* A national survey of Ixodidae ticks on privately owned dogs in Italy. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. *et al.* Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescription, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 1, n. 2, p. 75–99, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*, v. 135, n. 1, p. 15–23, 2004.

MASSUNG, R. F.; SLATER, K.; OWENS, J. H. *et al.* Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of clinical microbiology*, v. 36, n. 4, p. 1090–1095, 1998.

MÁTHÉ, Á.; DOBOS-KOVÁCS, M.; VÖRÖS, K. Histological and ultrastructural studies of renal lesions in *Babesia canis* infected dogs treated with imidocarb. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 55, n. 4, p. 511–523, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18277710>><<http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/AVet.55.2007.4.10>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

MAURELLI, M. P.; PEPE, P.; COLOMBO, L. *et al.* A national survey of Ixodidae ticks on privately owned dogs in Italy. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A. *et al.* The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 11, p. 4015–4023, 2006.

MCDADE, J. E. Ehrlichiosis—A disease of animals and humans. *Journal of Infectious Diseases*, v. 161, n. 4, p. 609–617, 1990.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it”. *European Journal of Protistology*, v. 29, n. 3, p. 279–293, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80371-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80371-8)>.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. In: *Advances in parasitology*, v. 23, p. 37–103, 1985. Academic Press, 1985. p. 37–103. 1985. v. 23.

MENDONÇA, C. DE S.; MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S. *et al.* Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *J. Biosci.*, v. 21, n. 1, p. 167–174, 2005.

MIRANDA, R. L.; CASTRO, J. R.; OLEGÁRIO, M. M. *et al.* Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Veterinary Parasitology*, v. 177, n. 3–4, p. 392–396, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.044>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

MIRANDA, R. L.; O'DWYER, L. H.; CASTRO, J. R. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 97, n. 2, p. 325–328, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.015>>. Acesso em: 07 fev. 2019.

MITCHELL, K.; KRUTH, S. Immune-Mediated Hemolytic Anemia and Other Regenerative Anemias. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, R. C. (Org.). *Textbook of veterinary internal medicine*. [S.l.: s.n.], 2010. p. 763–772.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B. *et al.* 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*, v. 10, n. 9, 2015.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A. *et al.* Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C. *et al.* New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 9, n. 1, p. 73–78, 2009. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2007.0227>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MORAES, P. H. G.; RUFINO, C. P.; BARAÚNA, A. R. F. *et al.* Molecular characterization of *Babesia vogeli* in dogs from Belém, northern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 16364–16371, 2015. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2015/vol14-4/pdf/gmr5405.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MORAIS, N. C.; DE CASTRO, J. R.; MUNDIM, A. V. *et al.* Clinical and hematological aspects of dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. and *Leptospira interrogans*. *Bioscience Journal*, v. 27, n. 3, p. 452–459, 2011. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79959968826&partnerID=40&md5=f81da09796ee3d71e5a6e6d713309f35>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MOREIRA L.; VILARDO M.; BITENCOURT GUIMARÃES, L. *et al.* Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. *Archives of Veterinary Science*, v. 18, n. 3, 2013..

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B. *et al.* Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Retrospective study ( 1998 - 2001 ) on canine. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 2, p. 1–7, 2003.

MOREIRA, S. M.; MACHADO, R.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs detecção de *Ehrlichia canis* em aspirados de medula óssea de cães experimentalmente infectados. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 35, n. 4, p. 958–960, 2005.

MUNDIM, A. V.; JACOMINI, J. O.; MUNDIM, M. J. S. *et al.* *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia,

Minas Gerais. Relato de dois casos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 29, n. supl., p. 359–361, dez. 1992.

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G. *et al.* Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Revista brasileira de parasitologia veterinária: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 206–12, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070428>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MURASE, T.; UEDA, T.; OSAMU, Y. *et al.* Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 58, n. 3, p. 259–261, 1996.

MYLONAKIS, M. E.; DAY, M. J.; SIARKOU, V. *et al.* Absence of Myelofibrosis in Dogs with Myelosuppression Induced by *Ehrlichia canis* Infection. *Journal of Comparative Pathology*, v. 142, n. 4, p. 328–331, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.09.003>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, n. 3, p. 174–184, 2004. Disponível em: <<http://jaaha.org/doi/abs/10.5326/0400174>>. 30 jan. 2019.

MYLONAKIS, M. E.; BORJESSON, D. L.; LEONTIDES, L. *et al.* Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 40, n. 1, p. 78–83, 2011.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C. *et al.* Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, v. 91, n. 2–3, p. 197–204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; KONSTANTINA, T. N. Canine monocytic ehrlichiosis: An update on diagnosis and treatment. *Acta Veterinaria*, v. 67, n. 3, p. 299–317, 2017.

MYR PROJETO SUSTENTÁVEIS. CARACTERIZAÇÃO GERAL. Belo Horizonte: CBH VELHAS/AGB Peixe Vivo. 2013. Disponível em: <[http://cbhvelhas.org.br/images/subcomites/Itabirito/093\\_REL\\_PROD\\_2\\_R06\\_REV1\\_140315.pdf](http://cbhvelhas.org.br/images/subcomites/Itabirito/093_REL_PROD_2_R06_REV1_140315.pdf)>. Acesso em: 25 out. 2017.

NAING, L.; WINN, T.; RUSLI, B. N. Practical issues in calculating the sample size for prevalence studies. *Archives of Orofacial Sciences*, v. 1, n. Ci, p. 9–14, 2006.

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

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M. *et al.* Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitology*, v. 190, n. 3–4, p. 547–555, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.032>>. Acesso em: 05 dez. 2019.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T. *et al.* The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T. *et al.* ACVIM consensus statement. *J Vet Intern Med*, v. 16, n. 1, p. 309–315, 2002.

NEITZ, W. O. Classification, transmission, and biology of piroplasms of domestic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 64, n. 2, p. 56–111, 1956.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. *et al.* Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 1980.

O’CONNOR, T. P.; HANSCOM, J. L.; HEGARTY, B. C. *et al.* Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *American Journal of Veterinary Research*, v. 67, n. 2, p. 206–210, 2006.

O’DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 3, p. 143–150, 2001.

O’DWYER, L. H.; SAITO, M. E.; HASEGAWA, M. Y. *et al.* Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 688–690, 2006.

O’DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. (Org.). *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. 1. ed. Rio de Janeiro: LF Livros, 2002. p. 58–67.

O’DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Hepatozoonose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. (Org.). *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. Rio de Janeiro: LF Livros, 2002. p. 80–87.

OLIVEIRA, A. C. Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia molecular, alterações hematológicas e centrifugação por gradiente. *Tese*, p. 51, fev. 2015.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO, L. C. *et al.* First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 55–56, 2009.

OLMEDA, A. S.; ARMSTRONG, P. M.; ROSENTHAL, B. M. *et al.* Short report: A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, v. 67, n. 3, p. 229–234, 1997.

OTRANTO, D.; TESTINI, G.; DANTAS-TORRES, F. *et al.* Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: A longitudinal study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3316–3324, 2010.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S. *et al.* Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology

and PCR. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, p. 55, 2011. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-55>>. Acesso em: 08 fev. 2019.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 5, p. 228–235, 2009.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O. *et al.* Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 23, n. 1, p. 71–74, 2002.

PAIM, F. C.; DOS SANTOS, A. P.; DO NASCIMENTO, N. C. *et al.* Development of a quantitative PCR for the detection of *Rangelia vitalii*. *Veterinary Parasitology*, v. 217, p. 113–117, 2016.

PAIM, F. C.; DA SILVA, A. S.; PAIM, C. B. V. *et al.* Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Veterinary Parasitology*, v. 192, n. 1–3, p. 137–142, 2013.

PALACIOS, M.; ARTEAGA, R.; CALVO, G. High-dose filgrastim treatment of nonregenerative pancytopenia associated with chronic canine ehrlichiosis. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 32, n. 1, p. 28–30, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2017.05.005>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

PALUDO, G. R.; DELL'PORTO, A.; DE CASTRO E TRINDADE, A. R. *et al.* *Hepatozoon* spp.: Report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 118, n. 3–4, p. 243–248, 2003.

PARAENSE, W. L.; VIANNA, Y. L. *Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro*. [S.l.]: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz., 1948

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C. *et al.* Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 4, p. 657–702, 2013.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 32, n. 6, p. 897–928, 2001. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/32/6/897>>. Acesso em 12 fev. 2019.

PASCOAL, J. DE O.; AMORIM, M. DO P.; MARTINS, M. M. *et al.* Ticks on birds in a savanna (Cerrado) reserve on the outskirts of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 1, p. 46–52, 2012.

PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B. *et al.* First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 81–85, 2005.

PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE) no canil da escola de veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, n. 1, p. 41–44, 2008.

PEGRAM, R. G.; KEIRANS, J. E.; CLIFFORD, C. M. *et al.* Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology*, v. 10, n. 1, p. 27–44, 1987.

PENZHORN, B. L. Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective. *Parasites and Vectors*, v. 4, n. 1, p. 2–7, 2011.

PEREIRA, A. B. MATA ATLÂNTICA: UMA ABORDAGEM GEOGRÁFICA. *Nucleus*, v. 6, n. 1, p. 27–52, 20 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/152/279>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C. *et al.* Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. out. 2006, [S.l: s.n.], out. 2006. p. 110–117.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 9, p. 2133–2139, 1996.

PETROV, E. A.; ULCAR, I.; CELESKA, I. *et al.* Short communication effects of doxycycline treatment on hematological and blood biochemical parameters in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. v. 41, n. 1, p. 99–105, 2018.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. *et al.* Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, v. 41, n. 3, p. 324–332, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.324>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

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

PRADO, L. G.; PALHARES, M. S.; BASTOS, C. DE V. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* direct detection and exposure evidence in equines from two breeding farms from Minas Gerais State, Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, v. 85, p. 1–6, 2018.

PROMEGA CORPORATION. GoTaq(R) Green Master Mix. *Promega Corporation*, p. 2, 2016. Disponível em: <<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotag-green-master-mix-protocol.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2018.

RAMOS, C. A. DO N.; BABO-TERRA, V. J.; PEDROSO, T. C. *et al.* Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, n. 2, p. 247–250, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612015000200247&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612015000200247&lng=en&tlng=en)>.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARA??JO, F. *et al.* Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitology Research*, v. 107, n. 5, p. 1115–1120, 2010.

RAMOS, R. A. N.; LATROFA, M. S.; GIANNELLI, A. *et al.* Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, v. 205, n. 1–2, p. 285–288, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.023>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

RENÉ-MARTELLET, M.; MORO, C. V.; CHÈNE, J. *et al.* Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0525-3>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T. *et al.* Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 2, 2017.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O. *et al.* Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 27, n. 2, p. 285–289, 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84781997000200019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781997000200019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 4, n. 3, p. 286–308, 1991.

RIKIHISA, Y.; KREIER, J. P. Incertae Sedis V. *Aegyptianella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Online*. [S.l: s.n.], 2015. p. 1–5.

RIKIHISA, Y.; ZHANG, C.; CHRISTENSEN, B. M. Molecular Characterization of *Aegyptianella pullorum* (Rickettsiales, Anaplasmataceae). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 11, p. 5294–5297, 2003.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; WEISIGER, R. M. *et al.* Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infection and Immunity*, v. 6, n. 3, p. 226–231, 1972.

RODRIGUES, D. F.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A. F. S. F. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 4, p. 185–188, 2008.

RODRIGUES, D. S.; DE CARVALHO, H. A.; FERNANDES, A. A. *et al.* Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6, p. 853–856, 2002.

ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V. *et al.* 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*, v. 199, n. 3–4, p. 121–128, 2014.

ROOPALI, B.; MAHADAPPA, P.; SATHEESHA, S. P. *et al.* Acute hepatozoonosis in dogs: a case report. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 41, n. 3, p. 747–749, 2017.

ROTONDANO, T. E. DE F.; KRAWCZAK, F. DA S.; BARBOSA, W. DE O. *et al.* *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 26, n. 2, p. 211–215, 2017.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. D. S.; LOPES, V. V. A. *et al.* Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil. *Parasitology Research*, v. 102, n. 5, p. 895–899, 2008.

RUBINI, A. S.; DOS SANTOS PADUAN, K.; CAVALCANTE, G. G. *et al.* Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitology Research*, v. 97, n. 2, p. 91–93, 2005.

SÃO PAULO. Programa de controle de populações de cães e gatos do estado de São Paulo. *Boletim epidemiológico paulista*, v.6, supl. 7, 2009. Disponível em: <[http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/publicacoes/publicacoes-ccd/manuais-normas-e-documentos-tecnicos/manuaisnormasedocumentostecnicos1\\_-\\_manual\\_de\\_controle\\_de\\_populacoes\\_de\\_caes\\_e\\_gatos\\_no\\_estado\\_de\\_sao\\_paulo\\_-\\_2009.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/publicacoes/publicacoes-ccd/manuais-normas-e-documentos-tecnicos/manuaisnormasedocumentostecnicos1_-_manual_de_controle_de_populacoes_de_caes_e_gatos_no_estado_de_sao_paulo_-_2009.pdf)> Acesso em 15 fev 2019.

SACCHI, A. B. V.; DUARTE, J. M. B.; ANDRÉ, M. R. *et al.* Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, n. 4, p. 325–334, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.02.001>>. Acesso em 08 fev. 2019.

SAINZ, Á.; ROURA, X.; MIRÓ, G. *et al.* *Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasites and Vectors*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/75>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

SÁNCHEZ, R. O.; MORÉ, G.; EIRAS, D. F. Morfología de estructuras parasitarias de *Rangelia vitalii* en muestras de perros naturalmente infectados. *Analecta Veterinaria*, v. 37, n. 2, p. 60–65, 2017.

SANTANA, B. B.; RAMOS, R. A. N.; SANTANA, M. DE A. *et al.* Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and their associations in Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 276–280, 2013.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; DÜMLER, J. S. A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 46–47, 2009.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A. *et al.* Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Veterinary Journal*, v. 179, n. 1, p. 145–148, 2009.

SANTOS, H. A.; PIRES, M. S.; VILELA, J. A. R. *et al.* Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, n. 4, p. 770–774, 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638711406974>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

SANTOS, H. A.; THOMÉ, S. M.; BALDANI, C. D. *et al.* Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 348, 2013. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-348>>. Acesso em:

26 jan. 2019.

SANTOS, J. L. C.; MAGALHÃES, N. B.; SANTOS, H. A. DOS *et al.* Parasites of domestic and wild canids in the region of Serra do Cipó National Park, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 270–277, 2012.

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; G., L. *et al.* Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. *Veterinary Record*, p. 2–3, 2009.

SCHETTERS, T. P. M.; MOUBRI, K.; PRÉCIGOUT, E. *et al.* Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology*, 1997.

SCHOEMAN. Canine Babesiosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 40, n. 6, p. 1141–1156, 2009.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of *Babesia* and *Babesia* -Like Blood Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 3, p. 365–373, 2002.

SERRA-FREIRE, N. M. Caso índice de babesidade humana no Rio de Janeiro, Brasil. *Revista UNIABEU Belford Roxo*, v. 7, n. 15, p. 76–85, 2014.

SHARIFIAN, H. *Errors induced during PCR amplification*. Dissertação. 52 f. 2010.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J. *et al.* Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*. [S.l.: s.n.], fev. 2001

SHOEMAKER, D. D. W.; MACHADO, C. A.; MOLBO, D. *et al.* The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: Correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 269, n. 1506, p. 2257–2267, 2002.

SILVA, A. B.; COSTA, A. P.; DE SÁ, J. C. *et al.* Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na Mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro. *Ciencia Animal Brasileira*, v. 13, n. 3, p. 388–395, 2012.

SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; COSTA, M. M. *et al.* Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Experimental Parasitology*, v. 128, n. 4, p. 347–352, 2011.

SILVA, A. S.; MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M. *et al.* Influence of experimental canine ehrlichiosis on the E-ADA activity and purine levels in serum and possible functional correlations with pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, v. 166, n. 3–4, p. 602–606, 2013.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 285–291, 2001.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A. *et al.* Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais. *Bioscience Journal*, v. 30, n. 2, p. 892–900, 2014.

SILVA, N. B.; TAUS, N. S.; JOHNSON, W. C. *et al.* First report of *Anaplasma marginale* infection in goats, Brazil. *PLoS ONE*, v. 13, n. 8, p. 1–6, 2018.

SILVEIRA, J. A. G. DA. *DINÂMICA POPULACIONAL DE Rhipicephalus sanguineus (Latrielle, 1806), EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS*. 2008. 57 f. 2008.

SILVEIRA, J. A. G. DA; RABELO, É. M. L.; LIMA, P. C. S. *et al.* Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 206–215, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612014000200206&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000200206&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 29 out. 2018.

SILVEIRA, J. A. G.; REIS, I. A.; ESTEVAM, L. G. T. M. *et al.* Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 37, n. 9, p. 958–962, 2017.

SILVEIRA, J. A. G.; D'ELIA, M. L.; AVELAR, I. DE O. *et al.* *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 5, n. 3, p. 280–285, 2016.

SILVEIRA, J. A. G.; D'ELIA, M. L.; DE OLIVEIRA AVELAR, I. *et al.* *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 5, n. 3, p. 280–285, 2016.

SILVEIRA, J. A. G.; VALENTE, P. C. L. G.; PAES, P. R. O. *et al.* The first clinical and laboratory evidence of coinfection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, n. 3, p. 242–245, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.003>>. Acesso em: 28 fev. 2018

SILVEIRA, J. A. G.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 161, n. 3–4, p. 270–275, 2009.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens of the Family Anaplasmataceae in Brazilian Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and Marsh Deer (*Blastocercus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 59, n. 4, p. 353–360, 2012.

SIMPSON, R. M.; GAUNT, S. D.; HAIR, J. A. *et al.* Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *American Journal of Veterinary Research*, 1991.

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H. *et al.* Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic *Rickettsia*. *American Journal*

of *Veterinary Research*, 1976.

SMITH, T. G. The Genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology*, v. 82, n. 4, p. 565, 1996.

SOARES, J. F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P. E. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 180, n. 3–4, p. 203–208, 2011.

SOARES, J. F.; COSTA, F. B.; GIROTTO-SOARES, A. *et al.* Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliellosis. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 5, p. 1221–1234, 2018.

SOARES, R.; RAMOS, C. A.; PEDROSO, T. *et al.* Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo grande, Mato grosso do sul, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 1, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; CAPRÌ, A.; PENNISI, M. G. *et al.* Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, 2015.

SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; CARLI, E. *et al.* *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*, v. 157, n. 3–4, p. 211–221, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; RAZIA, L. *et al.* Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 515–518, 2006.

SOUSA, K. C. M.; FERNANDES, M. P.; HERRERA, H. M. *et al.* Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, n. April, p. 0–1, 2017.

SOUSA, K. C. M.; ANDRÉ, M. R.; HERRERA, H. M. *et al.* Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 4, p. 525–31, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473877>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; ZAGO, A. M. *et al.* *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 163, n. 4, p. 357–361, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. D. M.; CAMPOS, W. N. D. S. *et al.* Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 3, p. 253–5, 2011.

SPOLIDORIO, M. G.; MINERVINO, A. H. H.; VALADAS, S. Y. O. B. *et al.* Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 214–9, 2013.

STARKEY, L. A.; NEWTON, K.; BRUNKER, J. *et al.* Prevalence of vector-borne pathogens in dogs from Haiti. *Veterinary Parasitology*, v. 224, p. 7–12, 2016.

STEGEMAN, J. .; BIRKENHEUER, A. J.; KRUGER, J. M. *et al.* Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, v. 222, n. 7, p. 959–963, 2003.

STICH, R. W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G. *et al.* Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, v. 158, n. 4, p. 256–273, 2008.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Erythrocytes. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. (Org.). *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2th. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008a. p. 110–211.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Urinary system. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. (Org.). *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008b. p. 416–487.

STRIK, N. I.; ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. *et al.* Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 3, p. 262–268, 2007.

SYKES, J. E. Ehrlichia, Anaplasmosis, Rocky Mountain Spotted Fever, and Neorickettsial Infection. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E. C. (Org.). *Textbook of veterinary internal medicine*. Seventh ed. St. Louis: Elsevier, 2010. p. 901–908.

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

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F. *et al.* Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary Parasitology*, v. 130, n. 1–2, p. 131–140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; DE SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M. *et al.* Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, n. 1–2, p. 72–74, 2010.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, n. July, p. 1–9, 2013. Disponível em:

THAKUR, N.; GE, C.; LEKSHMAN, A. Therapeutic management of *Hepatozoon canis* induced acute hepatitis in a dog Therapeutic management of *Hepatozoon canis* induced acute hepatitis in a dog. v. 6, n. August, p. 1037–1039, 2018.

THEODOROU, K.; MYLONAKIS, M. E.; SIARKOU, V. I. *et al.* Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013.

TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; FRANCHIN, A. G. *et al.* Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savanna) in the municipality of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia*

veterinaria = *Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, v. 19, n. 4, p. 244–248, 2010.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O. *et al.* Babesia gibsoni genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 141, n. 1–2, p. 177–180, 2006.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O. *et al.* Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. v. 140, n. 2006, p. 223–230, 2006.

UILENBERG, G. Babesia-A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1–2, p. 3–10, 2006.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F. F.; PERIÉ, N. M. *et al.* Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *The Veterinary quarterly*, v. 11, n. 1, p. 33–40, 1989.

UILENBERG, G.; VERDIESEN, P. A.; ZWART, D. Imidocarb: a chemoprophylactic experiment with *Babesia canis*. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, v. 106, n. 14, p. 118–123, 1981.

UNVER, A.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 482–486, 2006.

USPENSKY, I.; IOFFE-USPENSKY, I. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) infestations in and near human dwellings. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 291, p. 156–163, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1438-4221\(02\)80030-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1438-4221(02)80030-3)>. Acesso em: 14 jan. 2019

VANSTREELS, R. E. T.; YABSLEY, M. J.; PARSONS, N. J. *et al.* A novel candidate species of *Anaplasma* that infects avian erythrocytes. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANDRÉ, M. R.; FARIA, J. L. M. *et al.* Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, v. 186, n. 3–4, p. 254–260, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

VAUGHAN, J. A.; TKACH, V. V.; GREIMAN, S. E. *Neorickettsial Endosymbionts of the Digenea: Diversity, Transmission and Distribution*. [S.l.]: Elsevier, 2012. v. 79. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398457-9.00003-2>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1–2, p. 147–160, 2006.

VIEIRA, F. DE T.; ACOSTA, I. C. L.; MARTINS, T. F. *et al.* Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 249, n. March 2017, p. 43–48, 2018.

VIEIRA, F. T.; LABRUNA, M. B.; BARBOSA, A. C. M. S. *et al.* Occurrence of ticks in dogs in a hospital population in the state of Espírito Santo, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 38, n. 3, p. 519–521, 2018.

VIEIRA, R. F. DA C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S. *et al.* Ehrlichiosis in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2011.

WAGNER, G.; CRUZ, D.; HOLMAN, P. *et al.* Non-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87, n. III, p. 193–199, 1992.

WALKER, D. H. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annual review of public health*, v. 19, p. 237–69, 1998.

WANDELER, A. I.; MACPHERSON, C. N. L.; MESLIN, F.-X. (Ed.). *Dogs, Zoonoses, and Public Health*. CABI Pub, 2000.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H. *et al.* Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs Trevor. *Veterinary Parasitology*, v. 69, p. 307–317, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D. J. *et al.* Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 48, n. 1–2, p. 177–182, 1995.

WANER, T.; LEYKIN, I.; SHINITSKY, M. *et al.* Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 77, n. 1–2, p. 145–150, 2000.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F. *et al.* 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*, v. 95, n. 1, p. 1–15, 2001.

WANG, J.; ZHANG, J.; KELLY, P. *et al.* First description of the pathogenicity of *Babesia vogeli* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 253, n. February, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.028>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

WARDROP, K. J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A. *et al.* Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 19, n. 1, p. 135–142, jan. 2005.

WEI, L.; KELLY, P.; ACKERSON, K. *et al.* First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, 2014.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M. *et al.* Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 7, p. 1852–1855, 1997.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. D. A. *et al.* Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6Supl2, p. 3811, 17 dez. 2013.

WU, D. Y.; UGOZZOLI, L.; PAL, B. K. *et al.* The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the Polymerase Chain Reaction. *DNA and Cell Biology*, v. 10, n. 3, p.

233–238, 1991.

YOUNG, A. S.; MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, v. 2, n. 8, p. 211–219, 1986.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H. *et al.* Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, v. 84, n. 7, p. 544–548, 1998.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E. *et al.* Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 89, n. 3, p. 241–248, 2000.

## Apêndice I - Questionário aplicado aos tutores de cães no município de Itabirito – MG

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_ **Nº:** \_\_\_\_\_ **Complemento:** \_\_\_\_\_

Nome do Tutor: \_\_\_\_\_ Nome do animal: \_\_\_\_\_

Idade do animal: \_\_\_\_\_ Sexo do animal: ( ) F ( ) M Raça: \_\_\_\_\_

**1. Qual a forma em que você adquiriu o cão?**

( ) Adoção ( ) Ganhou desde filhote ( ) Compra ( ) Ganhou de alguém que não queria mais

**2. Há quanto tempo o cão está com você?** \_\_\_\_\_

**3. O cão já recebeu alguma vacina?**

Raiva: ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

Se SIM, onde foi vacinado? Na campanha da prefeitura ( ) Na Clínica Veterinária ( )

Recebe essa vacina todo ano? ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

Outras vacinas ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

Se SIM, qual(is)? \_\_\_\_\_

Recebe essa(s) vacina(s) todo ano? ( ) NÃO SEI ( ) NÃO ( ) SIM

**4. Você passeia com o seu cão?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se SIM: Usa guia (coleira)? ( ) SIM ( ) NÃO ( ) ÀS VEZES

Qual a frequência dos passeios? ( ) Todo dia ( ) 1x por semana ( ) 2x por semana ( ) Mais de 2x vezes por semana ( ) 1x por mês

**5. Onde o cão vive?** ( ) ÁREA RURAL ( ) ÁREA URBANA (CIDADE)

**6. O cão convive com outros animais?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se SIM: ( ) outros cães (quantos? \_\_\_\_\_) ( ) gatos ( ) galinhas ( ) animais silvestres

**7. Onde o cão passa a maior parte do tempo?**

( ) rua ( ) mata ( ) terreiro de casa ( ) interior de casa ( ) interior da casa e terreiro

( ) apartamento ( ) área comercial (loja, fábrica, entre outros) ( ) outros: \_\_\_\_\_

**8. Tem livre acesso à rua?** ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SE APLICA (vive em fazenda ou sítio)

**9. Já tomou remédio contra vermes (vermífugos)?** ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

Se SIM, qual remédio: \_\_\_\_\_

**10. Você já encontrou algum carrapato no corpo do cão?** ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

**11. Já usou algum remédio contra carrapatos no cão?** ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

Qual? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_

**12. O cão já foi tratado para doença do carrapato?** ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

**13. Já perdeu outro cão por doença de carrapato?** ( ) SIM ( ) NÃO ( ) NÃO SEI

**Obrigado pela participação!**

Contatos: Matheus Araújo de Alkmim (31) 99314-6774.

Profª Camila de Valgas e Bastos Castro (31) 98806-7262 (31) 3409-2082.

## Apêndice II - TCLE

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

#### Detecção de hemoparasitos e seus vetores na população de cães no município de Itabirito – MG

Pesquisador: Dra. Camila de Valgas e Bastos Castro

CIAEP/CEUA: 01.044.2013

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, tutor do(s) animal(is) \_\_\_\_\_ estou sendo convidado a participar de um estudo denominado “Detecção de hemoparasitos e seus vetores na população de cães no município de Itabirito – MG” cujos objetivos e justificativas são a de realizar o diagnóstico de parasitos do sangue em cães no município de Itabirito/MG, relacionando a provável infecção com a presença de carrapatos e o ambiente onde vivem os animais.

Estou ciente de que o grupo de pesquisa deste estudo realizará somente uma visita no imóvel e a minha participação no referido estudo será no sentido de permitir o exame clínico, coleta de carrapatos e de sangue na veia jugular (pescoço) ou veia cefálica (membro anterior) no (s) cão (es) que estão sob a minha responsabilidade, assim como coletar dados relacionados ao(s) mesmo(s).

Fui esclarecido de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como o entendimento da possibilidade de ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos na região, inclusive possíveis zoonoses, e orientação de conduta que devo tomar com auxílio do serviço de saúde do município, beneficiando a população canina, bem como a população humana.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, estou ciente de que meu (s) animal (is) será(serão) contido(s) para a execução das ações previstas, podendo no momento de contenção e coleta gerar desconforto a ele(s), tais como inchaço, vermelhidão e dor, nos locais de coleta.

Fui informado que a estimativa para o resultado do presente estudo é de 1 (um) ano a partir do início das coletas e estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é voluntária e posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo. Os membros da Ceua (Comissão de Ética no Uso de Animais) ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o Dr. Matheus Araújo de Alkmim, inscrito no CRMV sob o nº MG 15420. Além dele, a equipe do pesquisador principal: Professor Romário Cerqueira Leite (EV-UFGM); Professora Camila de Valgas e Bastos Castro (EV-UFGM); Professor Eduardo Bastianetto (EV-UFGM); Professora Júlia Angélica Gonçalves da Silveira (Instituto de Ciências Biológicas ICB-UFGM) e Fernanda Batista de Oliveira Santos (EV-UFGM), também se responsabilizará 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 o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos referidos ao final da página.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

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 a outra com o pesquisador.

**Contato:**

**Tel de Emergência:** Matheus Araújo de Alkmim (31) 99314-6774.

Email: [matheusalkmim@gmail.com](mailto:matheusalkmim@gmail.com)

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

**Escola de Veterinária da UFMG**

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

Itabirito, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

**Identificação do(s) animal(is)**

**Nome (s):** \_\_\_\_\_ **Espécie:** canina **Raça:** \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

*Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)*

### Apêndice III – Fitas consenso formadas após sequenciamento

>Contig. Anaplasmataceae Granulócitos/ Plaquetas: 99,18% de identidade com *Anaplasma platys* isolate CA07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (número de acesso no genbank: KC989957.1). Cão proveniente do bairro Portões.

ATCGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATCCTGTATAATCCCTGCGGG  
GGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAG  
GCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGA  
GGAAGGCCTTAGGGTTGTAATACTCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCC  
GGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTA  
AAGGGCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGAGCTGCTTTAA  
AACTGCCA **487 pb**

>Contig. Piro A/ Piro B – 99,49 % de identidade com *Babesia canis vogeli* isolate L98\_Peru 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (número de acesso no genbank: KY349103.1). Cão proveniente do bairro Portões.

ATACCCAAATCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGG  
AATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTAGCGTGT  
CGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTTTCGAGTTCGCTTTTGGGTTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTT  
GTTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCA **394 pb**

>Contig. Piro A/ Piro B – 92% de identidade com *Babesia canis vogeli* clone 9-1A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (número de acesso genbank: MH143394.1). Cão proveniente do bairro Portões.

CCTATGCAGGATGCAATACTAGGCGATGTCTGCAAGTCTAATCACGCTGACCCAACCCCCACCCAG  
TACCTCACCAAGGGCAGTCTATTGCGGACAGGGGTCAGAATCATTGCCTTAAAAACGGAACCTTAATTT  
TTAGTCGTAATAAAGGGGTTGGATAACTGTCTGGAGGATAGGATTTGGAATTTGGTTTGGCTGGGGCTAA  
CTGGCCTGAGGATTGTCTCGTTGGCATTTCGAAATTAAGAGAGTGTTCAGGCAAACCTTTGTCTTAAAT  
ACCTCGCCATGGCTAATAGACTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAG  
TATGAACGGTGGGGGGCATTTCGTATTTAAACC **378 pb**


>Contig. Gene *dsb* – 100 % de identidade com *Ehrlichia canis* strain YZ-1 chromosome, complete genome (número de acesso genbank: CP025749). Alinhamento de cinco amostras, sendo: três cães do bairro Portões e dois cães do canil (resgate).

TGCTTGTAATGTAGTGCATAATAGAAGTCTATGTACTTATTTGGATTAATCATATGTACAGCTAGTG  
CTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAAGACTCACCAAGTATTGGAAAATCTCTGAATATAACATGCACTTTAC  
CGTCTTGTACTATTTGTTTCATATCTTCAGACATCAT **176 pb**

>Contig Hepatozoon – 99,55 % de identidade com *Hepatozoon canis* isolate 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence (número de acesso genbank: KX712124.1)

ATACATGACCAAAATCTCAACTTTATTAGAAGAGACGCATTTATTAGATAAAAAGCCAGTTTCATGCTTT  
TACAGTATGAAAATTGGTGATTTATAATAACTTAGCAAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCAT  
TCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGG  
GATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGC  
GCAAATTACCAATTCTAACAGTTTGGAGAGAGGTAGTAACAAGAAATAACAATACAAGGCAGTTAAAA  
TGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG  
AAGTCTGCTGAAAGTAACCGGTCTGCTTTTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTATGTATTTA  
GCAATGATGTCCTTTGAAGTGTTTTTACTTTTATTGTAATAAAGCATATTCAGGACTTTTACTTTGAGAA  
AATTAGAGTGTCTTAGCACGCTGACGCTTTGAATACTGCAGCATGAAATAATAAGAAGAAACTTGAAT  
GATTTATCGCCTGTTTCACTTTGCGATTTGCTAAGTTATTATAAATCACCAATTTTCATACTGTAAG  
CATGAACTGGCTTTTTATCTAATAAATGCGTCTCTTCTAATAAAGTTGAGATTTTGCTCA **809pb**

## Anexo I - Anuência da Prefeitura Municipal de Itabirito – MG


 **PREFEITURA DE  
ITABIRITO**


**Declaração**

Itabirito, 20 de outubro de 2017

Declaro que Serviço de Controle Animal da Prefeitura Municipal de Itabirito está ciente e de acordo com a realização do Projeto de Mestrado em Ciência Animal, da Escola de Veterinária da UFMG, intitulado “Detecção de hemoparasitos e seus vetores na população de cães no município de Itabirito – MG”, do aluno Matheus Araújo de Alkmim, que será realizado no Centro de Controle Animal – CCA do município e no bairro Portões.


O Serviço de Controle Animal dará apoio ao projeto, por meio de seus funcionários e técnicos, para que este seja realizado da melhor forma possível, pois sabemos da importância da pesquisa e de seus benefícios.

  
Jadir Vicente da Silva Filho  
Gerente do Centro de Controle Animal- CCA.

  
Ana Liz Ferreira Bastos  
Diretora Técnica do Serviço de Controle Animal  
Prefeitura Municipal de Itabirito  
CRMV-MG 5200

Dr<sup>a</sup> Ana Liz Bastos  
Médica Veterinária  
CRMV-MG 5200

1

 **PREFEITURA MUNICIPAL DE ITABIRITO** Av. Queiroz Júnior, 635 - cep 35450-000 | Itabirito - Minas Gerais

## Anexo II – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: [290/2017](#)

Titulo do projeto: Detecção de hemoparasitos e seus vetores na população de cães no município de Itabirto – MG

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 na reunião do dia 30/10/2017. Validade: 30/10/2017 à 29/10/2022

Belo Horizonte, 31/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](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](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)