

Livio Martins Costa Júnior

**Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado
de Minas Gerais: utilização de métodos de diagnóstico direto,
indireto e molecular**

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Belo Horizonte
2007

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Livio Martins Costa Júnior

Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais: utilização de métodos de diagnóstico direto, indireto e molecular

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Lygia Maria Friche Passos

Co-Orientador: Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Belo Horizonte

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Dedico este trabalho aos meus pais, Livio e Maria, pelo esforço, exemplo de humildade e simplicidade e por uma vida digna e justa.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela ternura da criação, pela humildade perante os homens e pelo amor a todos;

A Prof^a. Lygia Maria Friche Passos pela orientação e ânimo ao incentivar a enxergar sempre a mais do que o convencional;

Ao Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro pela confiança em meu trabalho, apoio, amizade e orientação em todos os momentos desde o momento da minha chegada no Departamento de Parasitologia, além de ser um exemplo de humildade, profissionalismo e competência ;

A Prof^a. Élide Mara Leite Rabelo pelo carinho e atenção dispensada em todos os momentos necessários;

As Prof^a. Christiane M. B. M. da Rocha e Mariângela Carneiro pelas orientações durante o exame de qualificação, as quais fizeram grande diferença no resultado final deste trabalho;

Ao Prof. Kurt Pfister, Dr^a. Monika Zahler-Rinder e Dr. Jörg Hirzmann pela orientação e valiosas discussões durante o meu doutorado sanduíche no Instituto de Medicina Tropical Comparada e Parasitologia, da Universidade Ludwig Maximilian, Universidade de Munique, Alemanha;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia ICB/UFMG, em especial a Edward Félix Silva, Érika Martins Braga, Marcos Horácio Pereira, Marcos Pezzi Guimarães, Nelder de Figueiredo Gontijo, Marilene Michalick, e Norma Melo pelos ensinamentos e conselhos oferecidos durante toda esta etapa;

Aos professores da Universidade Estadual do Maranhão Ana Lúcia Abreu Silva, Daniel Praseres Chaves, e Rita Maria Seabra Nogueira Candanedo Guerra, pelos ensinamentos, incentivos e exemplo de profissionais mostrando que podemos fazer muito com pouco;

Ao Dr. John Furlong pela amizade, carinho e por ser um exemplo de ser humano, o qual admiro e tento seguir;

Aos pesquisadores da EMBRAPA Eneide Santiago Girão, Thelma Maria Saueressig, Alberto Gomes e Luiz da Silva Vieira, pelos ensinamentos durante os estágios oferecidos;

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

A Sumara Aparecida Ferreira, uma verdadeira mãe, doce, sensível, companheira e sempre preocupada com todos, observando nas pessoas o que há de melhor a ser visto;

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG, pela ajuda e por muitos momentos de alegria;

A Maria das Mercês Cota Vasconcelos pelos momentos de alegria e pela ajuda durante o experimento;

Aos motoristas da Escola de Veterinária da UFMG, que acompanharam as coletas, sendo além de motoristas, companheiros e muitas vezes auxiliares de coletas;

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB/UFMG) e de Protozooses (Escola de Veterinária/UFMG) Camila, Julia, Simone, Ana Paula, Ana Célia e Ricardo pelos auxílios no experimento e amizade durante toda a minha estadia na UFMG;

Aos amigos do Programa de Pós Graduação em Parasitologia Adriana, Ana Flávia, Andrey, Amália, Artur, Carina, Cristiane, Cíntia, Eduardo, Hudson, Michel, Raul, Renata, Rodrigo, Viviane por compartilharem tantos momentos de alegrias, tristeza e aflições;

Aos amigos do Instituto de Medicina Tropical Comparada e Parasitologia da Universidade Ludwig Maximilian, Universidade de Munique, Alemanha Sabine Bork-Mimm, Isabel Sander e Jeremie Gilles, por tornar os momentos mais alegres e menos solitário durante a minha estadia naquele instituto;

A Weverton Sampaio (*In Memoriam*), o qual era conhecido carinhosamente como Jaca, por ensinar a reclamar e querer sempre o melhor, reclamando de tudo e mais um pouco mas sempre com o sorriso no rosto mesmo nas horas mais estressante;

Aos meus amigos Elton, Francisco, Glauber, Marcelo, Marco Antônio e Raul pela convivência e ensinamentos durante as conversas nos finais de noite;

Aos meus amigos do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão: Marco Antônio Delmondes Bomfin, Rafael Cardoso Carvalho, Jocélio dos Santos Araújo, Érika Pereira Félix, e Marcelo de Sousa Andrade pelo apoio e por fazer as dificuldades iniciais de uma instituição se tornarem mais tranquilas;

Aos meus conterrâneos e amigos Alcina Vieira de Carvalho Neta, Ferdnam Almeida Melo e José Ribamar de Souza Torres Júnior, por me apoiarem e dividirem as dificuldades para serem ultrapassadas;

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

A Alexandra Martins dos Santos Soares por me incentivar me mostrando poder fazer aquilo que quero e me fazer pensar ter um futuro tranquilo e em paz;

Aos meus Tios Claudina Macatrão Pires Silva e Robinson Alves da Silva, por terem me adotado como filho várias vezes;

Aos meus irmãos Liviomar, Luiz e Marlívia, pelos incentivos, exemplos, ajuda, e carinho durante toda a minha vida;

A minha sobrinha Camylle por dar alegria e ser uma incentivadora (inconsciente) da minha vida, ao me dar esperança e ver que a vida é muito bonita;

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG pela oportunidade oferecida;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas;

A Universidade Estadual do Maranhão onde comecei a engatinhar ao encontro da ciência.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão, instituição que me acolheu e a qual sou parte integrante, muito obrigado por me dar a oportunidade de poder contribuir no início e poder levar ao interior do meu estado os conhecimentos que aprendo a cada dia, além da oportunidade única de dar a minha contribuição para o desenvolvimento de uma das regiões mais pobres do Brasil e onde tenho a minha origem.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

“Eu me senti bastante tolo quando ele fez observações a respeito da bela aparência de alguma planta com um nome espantosamente longo e me perguntou sobre o lugar em que ela habitava. Uma outra pessoa pareceu bastante surpresa que eu não soubesse nada a respeito de um carex vindo de não sei onde. Fui por fim forçado a alegar a mais completa ignorância e a declarar que não sabia sobre as plantas que havia coletado mais do que saberia sobre o homem da lua”

Charles Darwin

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Prevalência de <i>Babesia canis</i> no Brasil no período de 1990 – 2004 de acordo com as características e localização das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado	07
TABELA 02: Prevalência de <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Ehrlichia canis</i> no Brasil no período de 1990 – 2004 de acordo com as características e localização das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado	12
TABELA 03: Prevalência de <i>Anaplasma platys</i> no Brasil de acordo com as características e localização das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado	17
TABELA 04: Seqüência dos iniciadores utilizados nas PCRs	32
TABELA 05: Seqüência das sondas utilizadas nas PCRs em Tempo Real	33
TABELA 06: Taxa de prevalência e fatores associados com infecções de <i>Ehrlichia canis</i> diagnosticadas através de PCR em tempo real em cães oriundos de áreas rurais de Minas Gerais, Brasil, 2004.....	72
TABELA 07: Taxa de prevalência e fatores associados com infecções por <i>Anaplasma platys</i> diagnosticadas através de PCR em tempo real em cães oriundos de áreas rurais de Minas Gerais, Brasil, 2004.....	74

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Br	Controle negativo da PCR
CF	Citometria de Fluxo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ES	Esfregaço Sanguineo
EV	Escola de Veterinária da UFMG
FITC	Isotiocionato de Fluoresceína
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ITS	Espaço Interno Transcrito
ml	Mililitros
nPCR	Nested PCR
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Concentração Hidrogeniônica
PM	Padrão de peso molecular
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RFLP-PCR	Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
SRD	Sem Raça Definida
Ssu rDNA	Pequena Subunidade do rDNA
U	Unidade de Taq Polimerase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Luz Ultra Violeta
VG	Volume Globular

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais, utilizando métodos diretos, indiretos e moleculares. Durante a estação seca (Abril a Setembro) do ano de 2004 foram coletadas amostras sanguíneas e os ectoparasitos de 252 cães provenientes de áreas com características rurais do estado de Minas Gerais, sendo 100 cães da microrregião de Lavras, 102 cães da microrregião de Nanuque, e 50 cães da microrregião de Belo Horizonte. Após seis meses (Outubro a Março) correspondendo a estação chuvosa, realizou-se nova coleta sanguínea dos mesmos cães, sendo encontrado e coletado 71, 67, e 30 cães das microrregiões de Lavras, Belo Horizonte e Nanuque, respectivamente. Outras 100 amostras de sangue foram coletadas de cães dos centros urbanos, sendo 40 cães da microrregião Lavras, 40 cães da microrregião de Nanuque e 20 cães da microrregião de Belo Horizonte no período chuvoso. Reação de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* foi realizada utilizando o plasma das amostras. O DNA do sangue foi extraído e PCR em tempo real para *Babesia canis vogeli*, *B. canis rossi*, *B. canis canis*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* foi realizado, além da semi nested PCR realizado para o diagnóstico de *B. gibsoni*. Foi observado parasitando cães em áreas rurais das três regiões estudadas os carrapatos *R. sanguineus*, *A. cajennense* e *B. microplus*. Na região de Lavras além destas três espécies foi encontrado *A. tigrinum* e *A. ovale*. O carrapato mais prevalente foi *A. cajennense*, seguido de *R. sanguineus* e *B. microplus*. Foi observado uma maior prevalência de *B. canis vogeli* (através de RIFI e PCR em tempo real), *E. canis* (através de RIFI e PCR em tempo real) e *A. platys* (através de PCR em tempo real) em Nanuque e Belo Horizonte em comparação a prevalência encontrada na microrregião de Lavras, sugerindo haver diapausa do vetor e/ou interferência no desenvolvimento dos parasitos. Uma forte correlação entre a infestação por *R. sanguineus* e infecção por *B. canis vogeli*, *E. canis* e *A. platys* (PCR em tempo real) e *A. cajennense* e infecção por *E. canis* (RIFI e PCR em tempo real) e *B. canis* (RIFI) foi encontrada. Idade dos animais constitui um fator associado à infecção de *B. canis* e *E. canis* (RIFI) e animais de áreas rurais machos e SRD são mais expostos a *E. canis* (RIFI) do que fêmeas e cães de raça. Não encontramos nenhum animal infectado com *B. gibsoni*, e dentre as subespécies de *B. canis* apenas *B. canis vogeli* foi encontrada. Das seqüências de *B. canis* obtidas de produtos de PCR, apenas uma seqüência de Nanuque e uma outra

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

sequencia de Belo Horizonte tiveram 99% de identidade das seqüências de *B. canis vogeli* de áreas urbanas do Brasil, todas as outras seqüências obtidas tiveram 100% de identidade.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IX
RESUMO.....	X
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Babesia.....	02
1.1.1. Diagnóstico de <i>Babesia</i> spp.	04
1.2. <i>Ehrlichia canis</i>	09
1.2.1. Diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i>	10
1.3. <i>Anaplasma platys</i>	14
1.3.1. Diagnóstico de <i>Anaplasma platys</i>	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral.....	18
2.2. Específicos	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. Locais de realização do estudo	19
3.1.1. Áreas do estudo	19
3.1.2. Local das análises laboratoriais.....	21
3.2. Coleta e processamento das amostras	21
3.2.1. Coleta dos ectoparasitos	22
3.2.2. Identificação dos ectoparasitos	22
3.2.3. Identificação dos hemoparasitos	22
3.2.4. Coleta de sangue	23
3.2.5. Preenchimento do questionário.....	23
3.3. Produção de antígenos de <i>Babesia canis</i> para imunofluorescência	23
3.3.1. Obtenção de animais livres de hemoparasitoses	23
3.3.2. Infecção experimental com <i>B. canis</i> e acompanhamento dos animais	24

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

3.3.3. Preparação do antígeno de <i>B. canis</i>	24
3.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>B. canis vogeli</i>	25
3.4.1. RIFI para <i>Babesia canis vogeli</i>	25
3.4.2. RIFI para <i>Ehrlichia canis</i>	26
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional e PCR em tempo real) .	26
3.5.1. Extração de DNA.....	26
3.5.2. Dosagem do DNA.....	26
3.5.3. PCR em tempo real	26
3.5.3.a. Amplificação do DNA de subespécies de <i>B. canis</i>	27
3.5.3.b. Amplificação do DNA de <i>Ehrlichia canis</i>	28
3.5.3.c. Amplificação do DNA de <i>Anaplasma platys</i>	29
3.5.4. PCR convencional	30
3.5.4.a. Amplificação do DNA de <i>Babesia gibsoni</i>	30
3.5.4.a.1. Amplificação do DNA de <i>Babesia gibsoni</i> através da PCR	30
3.5.4.a.2. Amplificação do DNA de <i>Babesia gibsoni</i> através da semi nested PCR ...	31
3.6. Sequenciamento de <i>Babesia canis vogeli</i>	34
3.6.1. Análise das seqüências	35
3.7. Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Factors influencing the epidemiology of canine ehrlichiosis in rural areas of the state of Minas Gerais, Brazil. Veterinary Journal (in press)	37
4.2. Factors associated with seroprevalence of canine babesiosis in rural areas of the state of Minas Gerais, Brazil. <i>Research Veterinary Science</i> (aguardando aceite).....	41
4.3. Development and validation of a real time PCR for detecting subspecies of <i>Babesia canis</i> in endemic regions (fase final de elaboração).....	57
4.4. Fatores associados com a prevalência, através PCR em tempo real, de <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i>	71
4.4.1. Prevalência de <i>Ehrlichia canis</i> em áreas rurais	71
4.3.2. Incidência de <i>Ehrlichia canis</i>	73
4.3.3. Prevalência de <i>Anaplasma platys</i>	73

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

4.3.4. Incidência de <i>Anaplasma platys</i>	75
4.3.5. Discussão	75
5. RESUMO DOS RESULTADOS	78
6. CONCLUSÕES FINAIS	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. ANEXO	

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

1. INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses constituem um amplo grupo de parasitos que afetam os animais domésticos e silvestres e incluem vários gêneros dentre eles: *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, e *Mycoplasma*. As infecções por estes parasitos assumem importância na saúde animal por ocasionarem patologias variadas, podendo inclusive levar a morte.

No Brasil os principais hemoparasitos de cães são *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1985), *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935), *Anaplasma platys* (Harvey, Simpson & Gaskin, 1978), *Hepatozoon canis* (James, 1905) e *Mycoplasma haemocanis* (Kikuth, 1908). A transmissão destes parasitos ocorre principalmente pelo *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), sendo este o principal carrapato de cães de zona urbana (Ribeiro et al., 1997; Shaw et al., 2001; Labruna & Pereira, 2001).

Em cães de zona rurais os carrapatos do gênero *Amblyomma* são mais frequentemente encontrados assumindo importância em comparação ao *R. sanguineus* (Massard, 1979; O'Dwyer, 2000; Labruna & Pereira, 2001). Entretanto, no Brasil, o estudo de hemoparasitos em animais de áreas rurais limita-se a trabalhos de prevalências baseados em reações sorológicas, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e/ou esfregaços sanguíneos (Massard et al., 1979; O'Dwyer, 2000; Rodrigues et al., 2004; Pires et al., 2004; Rubini et al., 2004), tornando necessários estudos moleculares para um melhor estudo epidemiológico da verdadeira situação dos hemoparasitos dos cães.

1.1. Babesia

Babesia spp. são parasitos apicomplexas intraeritrocitários transmitidos por carrapatos, que infectam um grande número de hospedeiros podendo causar doença grave em animais domésticos e silvestres (Kuttler, 1988). Mais de 100 espécies de *Babesia* tem sido identificadas (Levine, 1988), entretanto poucas têm sido encontradas infectando cães, sendo *B. canis* e *B. gibsoni* (Patton, 1910) as espécies mais comumente encontradas.

B. gibsoni é uma pequena *Babesia* com tamanho dos merozoítos variando de 1 a 2,5 μm , comumente observados individualmente em formas circulares ou piriformes (Conrad et al., 1991; Taboada & Merchant, 1991). Esta *Babesia* é encontrada infectando cães predominantemente na Ásia, e com menor frequência na América do Norte, Oeste da África e Sul da Europa (Conrad et al., 1991; Casapulla et al., 1998; Lobetti, 1998; Birkenheuer et al., 1999; Shaw et al., 2001). No Brasil alguns relatos sugerem a ocorrência de uma pequena *Babesia* nos Estados do Rio Grande do Sul (Braccini et al., 1992) e São Paulo (Lucidi et al., 2004), e apenas uma confirmação molecular de *B. gibsoni* foi realizada recentemente em cães do Sul do Brasil (Trapp et al., 2006a). Os carrapatos incriminados como vetores da *B. gibsoni* são o *Haemaphysalis bispinosa* e *R. sanguineus* (Taboada & Merchant, 1991; Shaw et al., 2001).

B. canis é uma grande *Babesia* com merozoítos maiores que 2,5 μm de comprimento, piriformes que normalmente são encontrados aos pares dentro das hemácias, apresentando até oito ou mais merozoítos. Essa espécie é encontrada na Europa, África, Ásia, Índia, América do Norte, e América do Sul (Martinod et al., 1986; Uilenberg et al., 1989; Matjila et al., 2004). No Brasil esta espécie tem sido identificada pela morfologia dos merozoítos em quase todos os estados (Paraense &

Vianna, 1949; Dell'Porto, 1986; Ribeiro et al., 1990; Braccini et al., 1992). Os principais transmissores desta espécie de *Babesia* são os carrapatos *R. sanguineus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus* e *Haemaphysalis leachi* (Ristic, 1988; Taboada & Merchand, 1991; Shaw et al. 2001).

Uilenberg et al. (1989) observaram que isolados de *B. canis* da França, Norte e Sul da África eram transmitidas pelo *D. reticulatus*, *R. sanguineus* e *H. leachi*, respectivamente. Estes isolados apresentaram reatividade cruzada diferente, já que as cepas da França e do Norte da África não imunizaram cães contra a cepa do Sul da África e vice-versa. Baseado neste estudo, foi proposta uma nomenclatura diferenciando três subespécies de *B. canis*: *B. canis canis*, transmitida pelo *D. reticulatus*; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *R. sanguineus* e *B. canis rossi*, transmitida pelo *H. leachi*.

A patogenicidade varia de acordo com a subespécie de *B. canis*, sendo a *B. canis rossi* a responsável por uma babesiose clínica mais grave, a *B. canis canis* moderadamente patogênica, e a *B. canis vogeli* causando doença relativamente branda (Irwin & Hutchinson, 1991). Schetters et al. (1997) relatam as diferenças na patologia de *B. canis canis* e *B. canis rossi*, relacionando a patogenia da primeira aos efeitos sobre sistema de coagulação, e a patogenia de *B. canis rossi* à alta parasitemia periférica encontrada. Reatividade cruzada na sorologia tem sido observada utilizando a RIFI (Uilenberg et al., 1989), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Hauschild et al., 1995; Schetters et al., 1996) e Western Blotting (Hauschild et al., 1995).

Zahler et al. (1998) seqüenciando o primeiro e segundo espaço interno transcrito (ITS-1 e ITS-2) e a região 5.8S do rDNA, conseguiram segregar os isolados de *B. canis*, separando-os em três diferentes grupos de genótipo após o

alinhamento e construção do dendograma. No estudo observou-se a proximidade dos isolados de *B. canis canis* e *B. canis vogeli* em comparação com os de *B. canis rossii* que constitui um grupo separado das duas subespécies anteriores.

Passos et al. (2005), seqüenciando o fragmento 18S do rDNA de amostras de zonas urbanas de Minas Gerais (Belo Horizonte, Lavras e Uberlândia) e São Paulo, realizaram a primeira detecção molecular de *B. canis vogeli* no Brasil sendo observada identidade de 100% entre os isolados estudados.

Lopes et al. (2006) seqüenciando o fragmento 18S do rDNA de duas amostras de zona rural do estado de São Paulo encontraram identidade com *B. canis vogeli* já caracterizada no Brasil.

1.1.1. Diagnóstico de *Babesia* spp.

Não existem sintomas patognomônicos da babesiose, sendo o diagnóstico clínico baseado na anamnese e em sinais clínicos como febre, anemia, icterícia, anorexia, letargia, linfadenopatia e esplenomegalia (Abdullahi, 1990). Entretanto, estes sinais são comuns a outras doenças, como por exemplo, leptospirose, ehrlichiose, anaplasmosse, mycoplasmosse, cinomose e hepatite. Portanto, para um diagnóstico específico e definitivo é necessária a identificação do agente etiológico.

O diagnóstico laboratorial da babesiose pode ser realizado por meio da detecção do parasito (diagnóstico direto) ou pela detecção de anticorpos específicos, também conhecido como diagnóstico indireto (IICA, 1987; Böse et al., 1995).

O diagnóstico direto detecta o parasito, sua fluorescência ou parte dos seus nucleotídeos. As principais técnicas de identificação direta de *Babesia* spp. são esfregaços sangüíneos, gota espessa e testes utilizando o DNA do parasito, como

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nested PCR (nPCR), Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP-PCR) e PCR em tempo real (Böse, 1995; Matsuu et al., 2005; Martin et al., 2006; Jefferies et al., 2007).

O esfregaço sanguíneo realizado a partir de uma gota de sangue periférico é considerado o teste de escolha para diagnóstico durante a fase aguda da babesiose (Böse et al., 1995), entretanto em fase crônica onde a presença do parasito é escassa, torna-se difícil a visualização do mesmo parasito através deste método (Anderson, 1980; Levy et al., 1987; Wlosniewski et al., 1997). A gota espessa é um teste de alta sensibilidade em comparação à técnica de esfregaço sanguíneo e baixo custo, sendo bastante utilizado na Austrália em estudos epidemiológicos, entretanto, a diferenciação entre as espécies de *Babesia* é difícil, sendo feita apenas por técnico experiente (Böse et al., 1995).

O gene encontrado na pequena unidade ribossomal DNA (ssu-rDNA) tem sido amplamente utilizado para diagnóstico e diferenciação de espécies e subespécies de *Babesia* pela PCR, nPCR, RFLP-PCR, PCR em tempo real ou pelo método de Southern Blot (Conrad et al., 1992; Olmeda et al., 1997; Zahler et al., 1998; Carret et al., 1999; Fukumoto et al., 2001; Birkenheuer et al., 2003; Martin et al., 2006; Jefferies et al., 2007). Estes métodos de diagnóstico apresentam boa sensibilidade, entretanto requerem maior tempo de trabalho e são de custo elevado (Raymond et al., 1990; Hayden et al., 1991; Persing, 1991).

No diagnóstico indireto de *Babesia*, a sensibilidade e especificidade dependem principalmente do antígeno usado, cuja fonte primária é freqüentemente o sangue com alta parasitemia, originário de animais experimentalmente inoculados com cepas específicas de *Babesia* (Machado, 1991). Os métodos sorológicos

apresentam limitações, a principal delas é que apenas indicam a exposição ao agente, não informando sobre o estágio atual da infecção (Wagner et al., 1992).

O diagnóstico sorológico é muito utilizado para pesquisas epidemiológicas por permitir a detecção de animais portadores (Taboada & Merchant, 1991). Infecções recentes podem resultar em falsos negativos, uma vez que para detecção são necessários de cinco a 10 dias após a infecção (Boozer & Macintire, 2003).

Diversos métodos de diagnóstico indiretos, como a Fixação de complemento, Aglutinação em capilar, Imunocromatografia, RIFI e ELISA, são utilizados para o diagnóstico da babesiose canina, sendo a RIFI a mais utilizada pelo seu baixo custo e fácil operacionalidade (Todorovic, 1975; Taboada & Merchant, 1991; Boozer & Macintire, 2003; Aboge et al., 2007; Jia et al., 2007).

A prevalência da *B. canis* no Brasil varia consideravelmente (0,34 a 95,00%) de acordo com o método de diagnóstico utilizado, época do ano e amostra populacional utilizada (Tab. 1).

Em zonas rurais do Brasil não existem estudos epidemiológicos utilizando métodos moleculares, não se conhecendo geneticamente as amostras de *B. canis vogeli* nem a presença das outras subespécies de *B. canis* e de *B. gibsoni*.

Tabela 1: Prevalência de *Babesia canis* no Brasil no período de 1990 – 2004 de acordo com as características do parasito, da procedência das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado.

Prevalência (%)	Descrição dos animais estudados e localização	Método de Diagnóstico	Referência
0,34	Hemogramas de cães de zona urbana de Uberlândia - MG	ES	Santos et al., 2004
1,28	Prontuários de laboratório de Cuiabá - MT	ES	Moura et al., 2002
1,47	Cães de Campos dos Goytacazes - RJ	ES	Miranda et al., 2006
1,98*	Cães de áreas rurais de Juiz de Fora – MG	ES	Rodrigues et al., 2004
2,00*	Cães de áreas rurais do estado de São Paulo	ES	Lopes et al., 2006
2,00	Cães domiciliados em Juiz de Fora - MG	ES	Soares et al., 2006
2,50	Cães saudáveis atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	ES	Bicalho et al., 2004
2,76	Cães atendidos no hospital veterinário da UFRPE, Recife - PE	ES	Lima et al., 2006
4,00	Cães atendidos em clínicas de Belo Horizonte – MG	ES	Spiewak, 1992
5,20*	Cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro	ES	O'Dwyer, 2000
8,00	Cães de clínicas e domiciliados nos município de Ilhéus e Itabuna-BA	ES	Carlos et al., 2006
10,30	Cães de rua de São Paulo - SP	ES	Dell-Porto et al., 1993
10,38	Cães de rua de São Paulo - SP	ES	Dell-Porto et al., 1990
14,00	Cães de rua do Rio de Janeiro - RJ	ES	Paraense & Viana, 1949
18,11	Cães domiciliados no município de Campos – RJ	ES	Almeida et al., 2002
20,75	Cães capturados no município de Teresópolis – RJ	ES	Cardoso & Serra-Freire, 2001
22,71	Cães apreendidos pelo CCZ de Campos-RJ	ES	Almeida et al., 2002
24,70	Cães capturados no município de Silva Jardim – RJ	ES	Cardoso & Serra-Freire, 2001
26,92	Cães de rua de Juiz de Fora – MG	ES	Rodrigues et al., 2002
34,26	Cães de rua de Campos dos Goytacazes – RJ	ES	Almeida et al., 2006
41,39	Cães domiciliados de Campos dos Goytacazes – RJ	ES	Almeida et al., 2006
42,00	Estudo retrospectivo dos casos suspeitos de hemoparasitoses de Belo Horizonte	ES	Bastos et al., 2004
46,00	Cães com suspeitas de hemoparasitos da zona oeste do Rio de Janeiro – RJ	ES	Massad et al., 2006
18,80	Cães da cidade de Porteirinha – MG	RIFI	Maia et al., 2007
31,20	Cães da cidade de Porteirinha – MG (outubro/2003)	RIFI	Maia et al., 2004
34,10	Cães atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	RIFI	Spiewak, 1992
35,70	Cães atendidos em clinicas de Londrina – PR	RIFI	Trapp et al., 2006
41,10*	Cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro	RIFI	O'Dwyer, 2000

42,40	Cães de rua de São Paulo - SP	RIFI	Dell-Porto et al., 1993
42,45	Cães de rua de São Paulo - SP	RIFI	Dell-Porto et al., 1990
53,20	Cães com suspeitas de hemoparasitos	RIFI	Diniz et al., 2004
60,50	Cães saudáveis atendidos em clínicas de Belo Horizonte – MG	RIFI	Bicalho et al., 2001
66,90	Cães atendidos em clínicas de Belo Horizonte – MG	RIFI	Ribeiro et al., 1990
73,00	Cães oriundos da campanha de vacinação anti-rábica de Jaboticabal - SP	RIFI	Furuta et al., 2004
78,40	Cães apreendidos pelo CCZ de Belo Horizonte - MG	RIFI	Spiewak, 1992
95,00	Cães oriundos da campanha de vacinação anti-rábica de Jaboticabal - SP	ELISA	Furuta et al., 2004
22,80	Cães saudáveis atendidos em clínicas de Belo Horizonte - MG	CF	Bicalho et al., 2001
8,00*	Cães de áreas rurais do estado de São Paulo	PCR	Lopes et al., 2006
9,53	Cães com inclusões em leucócitos sugestivo de <i>Ehrlichia</i> em Jaboticabal - SP	PCR	Dagnone et al., 2004
9,70	Cães com inclusões intraplaquetárias de Campo Grande - MS	PCR	Souza et al., 2004

*Prevalência de cães de área rural, ES – Esfregaço Sanguíneo, RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta, ELISA – Ensaio Imunoenzimático, CF – Citometria de Fluxo, PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

1.2. *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis, agente etiológico da ehrlichiose monocítica canina, foi originalmente descrita por Donatien & Lestoquard (1935) na Argélia e atualmente tem uma ampla distribuição geográfica, apesar de ser endêmica nas regiões tropicais e subtropicais (Keefe et al., 1982). No Brasil este parasito foi descrito inicialmente em Belo Horizonte, Minas Gerais por Costa et al. (1973), que identificaram inclusões (mórulas) em linfócitos de um cão naturalmente infectado.

Taxonomicamente pertencem à ordem Rickettsiales (α_1 proteobacteria) e se caracterizam por ser gram negativas, pleomórficas e de crescimento intracelular obrigatório. Uma característica que diferencia as Ehrlichias das Rickettsias é que elas se replicam em vacúolos derivados da membrana celular das células infectadas, que são principalmente monócitos e macrófagos caninos (Oteo & Brouqui, 2005).

A Ehrlichiose Monocítica Canina se caracteriza por febre, depressão, anorexia, e perda de peso na fase aguda, com trombocitopenia e gamaglobulinemia como achados laboratoriais. Durante a fase crônica os sinais mais comuns são hemorragias, epistaxis, edema e choque hipotensivo, os quais podem levar à morte. A infecção subclínica é frequentemente encontrada e é associada com a persistência do organismo e aumento dos anticorpos séricos (Huxsoll et al., 1970; Buhles et al., 1974; Stephenson et al., 1975; Kuehn et al., 1985; Greene et al., 1990; Hoskins, 1991 a,b).

O principal vetor de *E. canis* é o ixodídeo *R. sanguineus*, coincidindo a distribuição geográfica mundial da Ehrlichiose canina com a distribuição deste carrapato (Winler et al., 1990, Labruna et al., 2005, 2007). Estes se infectam com *E. canis* ao se alimentarem em cães durante a fase aguda (Lewis et al., 1977; Swango et al., 1989). *E. canis* multiplica nos hemócitos, no trato digestivo e na glândula

salivar sendo transmitida a outros cães pela saliva do carrapato vetor (Rikihisa, 1991; Smith et al., 1976).

O *R. sanguineus* é vetor de diversos outros patógenos entre eles *B. canis*, *A. platys*, *H. canis* e *M. haemocanis* o que faz com que infecções mistas com estes parasitos sejam freqüentes (Christophers, 1906, 1907, 1912; O'Dwyer et al., 1997; Inokuma et al., 2000; Moreira et al., 2003; Vilar et al., 2004).

Embora carrapatos do gênero *Amblyomma* não tenham sido relatados como vetores de *E. canis*, o *A. americanum* é vetor de *E. chaffeensis* espécie muito próxima geneticamente e antígenicamente à *E. canis* (Anderson et al., 1991; Chen et al., 1994), podendo assim utilizar vetores similares para transmissão a hospedeiros susceptíveis, como tem sido comprovado experimentalmente com o *D. variabilis*. (Johnson et al., 1998).

1.2.1. Diagnóstico de *Ehrlichia canis*

O diagnóstico de infecções de *E. canis* inclui história de exposição a carrapatos, detecção dos sinais clínicos compatíveis ou anormalidades hematológicas, identificação de mórulas em esfregaços sangüíneos ou aspirados de tecidos, ou através de cultura de células, amplificação de DNA de *Ehrlichia* por PCR, além de testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos para *E. canis*. Apesar das limitações dos testes sorológicos, com respeito ao estabelecimento do estado da infecção e reatividade cruzada com outras espécies de *Ehrlichia*, muitos casos de Ehrlichiose canina são diagnosticados por RIFI (Wen et al., 1997; Suksawat et al., 2000).

A PCR convencional para *E. canis* apresenta sensibilidade semelhante à cultura de células, RIFI, e Western Blotting, entretanto pela rapidez, comodidade e

por ser um diagnóstico direto, este método é utilizado como teste de acompanhamento ao tratamento (Iqbal et al., 1994; Wen et al., 1997). Outras técnicas derivadas da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo, a nPCR, RFLP-PCR e PCR em tempo real (Murphy et al., 1998; Wen et al., 1997; Dagnone et al., 2003; Campagner et al., 2004; Labruna et al., 2007).

A prevalência de *E. canis* no Brasil varia de 0,12 a 92,31% dependendo da população estudada e do método de diagnóstico utilizado (Tab. 2) (Oliveira et al., 2000; Moura et al., 2002). Em zona rural poucos estudos têm sido realizados e a epidemiologia das erliquioses caninas é pouco conhecida. Em áreas rurais dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, foi observada uma prevalência de 4,80 e 5,94%, respectivamente, por meio de esfregaços sangüíneos (O'Dwyer, 2000; Rodrigues et al., 2004). Porém, esta prevalência provavelmente está subestimada, já que poucos cães com infecção aguda de *E. canis* apresentam mórulas em esfregaços sanguíneos (Woody & Hoskins, 1991).

Apenas um estudo realizou o diagnóstico de *E. canis* em áreas rurais do Brasil, por testes de diagnósticos indiretos. Este estudo foi realizado no município de Monte Negro (Rondônia) e foi observada uma prevalência de 24,80% dos cães infectados (Aguilar et al., 2007), entretanto estudos de epidemiologia mais aprofundados são necessários em outras regiões do Brasil.

Tabela 2: Prevalência de *Ehrlichia* spp. e *Ehrlichia canis* no Brasil no período de 1990 – 2004 de acordo com as características do parasito, da procedência das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado.

Prevalência (%)	Descrição dos animais estudados e localização	Método de Diagnóstico	Referência
0,12 (<i>E. canis</i>)	Prontuários de Laboratório de Cuiabá – MS	ES	Moura et al., 2002
1,21 (<i>E. canis</i>)	Hemogramas realizados em São João da Boa Vista - SP	ES	Pichotano et al., 2004
4,28 (<i>E. canis</i>)	Cães sem sintomatologia de área urbana de Niterói – RJ	ES	Moreira & Castro, 2004
4,80 (<i>E. canis</i>)*	Cães de área rural do estado do Rio de Janeiro	ES	O'Dwyer, 2000
5,51 (<i>E. canis</i>)	Cães atendidos no hospital veterinário da UFRPE, Recife - PE	ES	Lima et al., 2006
7,00 (<i>E. canis</i>)	Cães de áreas urbana de Ilhéus e Itabuna - BA	ES	Carlos et al., 2006
7,78 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães domiciliados de Campos dos Goytacazes – RJ	ES	Almeida et al., 2006
9,72 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães de rua de Campos dos Goytacazes – RJ	ES	Almeida et al., 2006
14,16 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães de áreas urbana de Uberlândia – MG	ES	Santos et al., 2004
14,82 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães atendidos em clínicas e hospitais veterinários de Campos dos Goytacazes – RJ	ES	Miranda et al., 2006
14,89 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães do município de Barra de São Francisco – ES	ES	Moreira et al., 2004
16,00 (<i>E. canis</i>)	Cães domiciliados em Juiz de Fora - MG	ES	Soares et al., 2006
17,82 (<i>E. canis</i>)*	Cães de áreas rurais de Juiz de Fora – MG	ES	Rodrigues et al., 2004
21,38 (<i>E. canis</i>)	Estudo retrospectivo dos casos suspeitos de hemoparasitoses de Belo Horizonte – MG	ES	Moreira et al., 2003
29,00 (<i>E. canis</i>)	Cães suspeitos de hemoparasitos na região de São Carlos – SP	ES	Pereira et al., 2006
32,39 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães domiciliados no município de Campos – RJ	ES	Almeida et al., 2002
39,73 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães apreendidos pelo CCZ de Campos – RJ	ES	Almeida et al., 2002
77, 97 (<i>E. canis</i>)	Cães suspeitos para ehrlichiose em Juiz de Fora – RJ	ES	Rodrigues-Daemon et al., 2006
10,37 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães com idade < 1 ano atendidos em clínica no Rio Grande do Sul	Distensão de gota de coágulo	Seibert et al., 1997
17,81 (<i>E. canis</i>)	Cães de Novo Cruzeiro - MG	RIFI	Galvão et al., 2002
21,27 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães do município de Barra de São Francisco – ES	RIFI	Moreira et al., 2004
24,80 (<i>E. canis</i>)*	Cães de área rural de Monte Negro – RO	RIFI	Aguiar et al., 2007
37,90 (<i>E. canis</i>)	Cães de área urbana de Monte Negro – RO	RIFI	Aguiar et al., 2007
19,80 (<i>E. canis</i>)	Cães atendidos em clínica do Brasil	Dot Blot ELISA ⁺	Labarthe et al., 2003
23,00 (<i>E. canis</i>)	Cães de hospital veterinário de Londrina - PR	Dot Blot ELISA ⁺	Trapp et al., 2006

23,00 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães atendidos em clínica de Londrina – PR	Dot Blot ELISA ⁺	Dagnone et al., 2002
33,33 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães do litoral de Santa Catarina	Dot Blot ELISA ⁺	Bellato et al., 2006
36,00 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães de zona urbana de Ilhéus e Itabuna - BA	Dot Blot ELISA ⁺	Carlos et al., 2006
46,67 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães domiciliados de Cabo de Santo Agostinho – PE	Dot Blot ELISA ⁺	Borba et al., 2002
92,31 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães suspeitos para ehrlichiose em Jaboticabal - SP	Dot Blot ELISA ⁺⁺	Oliveira et al., 2000
21,70 (<i>E. canis</i>)	Cães de hospital veterinário de Londrina - PR	RFLP - PCR	Dagnone et al., 2003
27,50 (<i>E. canis</i>)	Cães de clínicas veterinárias de Jaboticabal – SP	PCR	Paz e Silva et al., 2006
30,30 (<i>E. canis</i>)	Cães de clínicas veterinárias da cidade do Rio de Janeiro - RJ	PCR	Macieira et al., 2005
30,90 (<i>E. canis</i>)	Cães de Botucatu - SP	nPCR	Bulla et al., 2004
38,70 (<i>E. canis</i>)	Cães com inclusões intraplaquetárias de Campo Grande – MS	PCR	Souza et al., 2004
69,80 (<i>E. canis</i>)	Cães com suspeita de hemoparasitos	nPCR	Diniz et al., 2004
85,72 (<i>E. canis</i>)	Cães com inclusões em leucócitos em Jaboticabal – SP	PCR	Dagnone et al., 2004
9,79 (<i>Ehrlichia</i> spp.)	Cães atendidos em clínica de Itaboraí - RJ	clínico, e laboratorial	Solozabal et al., 2003

*Prevalência de cães de área rural, ⁺Kit SNAP 3Dx; ⁺⁺Kit Immunocomb, ES – Esfregaço Sanguíneo, RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta, ELISA – Ensaio Imunoenzimático, RFLP - PCR - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição, PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, nPCR – nested PCR.

1.3. *Anaplasma platys*

Anaplasma platys é uma bactéria intracelular obrigatória que parasita trombócitos circulantes de cães, sendo responsável pelo aparecimento de um quadro clínico denominado trombocitopenia cíclica canina. Este parasito foi primeiro identificado nos Estados Unidos da América em 1978 por Harvey, Simpson & Gaskin, sendo nomeado inicialmente como *Ehrlichia platys*. Dumler et al. (2001) ao analisarem um fragmento do gene 16S do rDNA, propuseram uma reorganização na taxonomia das famílias *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae*, colocando algumas espécies do gênero *Ehrlichia* no gênero *Anaplasma*.

Embora sem confirmação experimental, o carrapato *R. sanguineus* tem sido incriminado como o principal transmissor de *A. platys* (Hibler et al., 1986; Woody & Hoskins, 1991; Harrus et al., 1997), já que a infecção tem sido freqüentemente detectada nesta espécie (Inokuma et al., 2000; Brown et al., 2005). Brown et al. (2005) suspeitam que o piolho *Heterodoxus spiniger* possa ser o vetor desta bactéria durante o inverno na Austrália, já que a prevalência de *A. platys* e de *H. spiniger* nesta estação é alta, e a do *R. sanguineus* muito baixa. Entretanto, a grande dificuldade de se comprovar a competência vetorial tanto do *R. sanguineus* quanto do *H. spiniger* por métodos de biologia molecular é saber se o DNA detectado nestes artrópodes é oriundo de uma recente ingestão de sangue do hospedeiro ou se os artrópodes são realmente vetores desta bactéria (Inokuma et al., 2000; Brown et al., 2005). Woody & Hoskins (1991) relatam a possibilidade de transmissão direta pela inoculação de sangue infectado em animais susceptíveis.

Após um período de incubação de oito a 15 dias, a infecção aguda por *A. platys* é caracterizada por parasitemia cíclica de plaquetas seguida de trombocitopenia e linfadenomegalia generalizada (Baker et al., 1987). Cães

infectados normalmente não se apresentam clinicamente doentes e raramente demonstram sinais de hemorragia, até mesmo os que têm grave trombocitopenia (Harvey et al., 1978; Woody & Hoskins, 1991; Chang et al., 1996). Entretanto, amostras mais virulenta têm sido relatadas na Grécia e nos E.U.A. (Kontos et al., 1988 citado por Chang & Pan, 1996; Wilson, 1992). Na fase crônica o ciclo natural de plaquetas algumas vezes diminui, resultando trombocitopenia cíclicas associadas com parasitemias esporádicas (Harvey et al., 1978; Chang et al., 1996).

1.3.1. Diagnóstico de *Anaplasma platys*

Não existem sintomas patognomônicos da trombocitopenia cíclica canina, que ocorre comumente associada a outras doenças (Chang et al., 1996). Normalmente o diagnóstico da infecção de *A. platys* é realizado pela detecção de inclusões basofílicas dentro de plaquetas em esfregaços de sangue total ou de papa de leucócitos (*buffy coat*) corados com derivados de Romanowsky (Harvey et al., 1978; Woody & Hoskins, 1991; Martin et al., 2005). Entretanto, maior atenção deve ser dada a este tipo de diagnóstico, uma vez que corpúsculos de inclusão de *E. canis* podem ser observados em plaquetas (Dagnone et al., 2004; Souza et al., 2004). É importante ressaltar também a ocorrência cíclica de plaquetas parasitadas por *A. platys* (Harvey et al., 1978; Chang et al., 1996).

Como para *E. canis*, as técnicas sorológicas são bastante utilizadas para o diagnóstico da Anaplasmoze, entretanto a inabilidade de se distinguir infecção ativa de infecções anteriores é um dos maiores empecilhos deste tipo de diagnóstico. Assim, a PCR convencional, RFLP-PCR, nPCR e PCR em tempo real têm sido desenvolvidas e amplamente utilizadas (Chang & Pan, 1996; Inokuma et al., 2000; Hancock et al., 2001; Dagnone et al., 2003; Martin et al., 2005; Teglas et al., 2005).

A prevalência de *A. platys* no Brasil varia de 1,16 a 41,90% dependendo da população estudada e do método de diagnóstico utilizado (Tab. 3) (Moura et al., 2002; Souza et al., 2004). Rodrigues et al. (2004) observaram através de esfregaços sangüíneos, prevalência de 9,90% dos cães da zona rural de Juiz de Fora (MG) infectados com *A. platys*, sendo este o único relato deste parasito em zona rural do Brasil.

Tabela 3: Prevalência de *Anaplasma platys* no Brasil de acordo com as características do parasito, da procedência das amostras estudadas e método de diagnóstico utilizado.

Prevalência (%)	Descrição dos animais estudados e localização	Método de Diagnóstico	Referência
1,16	Prontuários de laboratório de Cuiabá - MT	ES	Moura et al., 2002
1,81	Hemogramas realizados em Laboratório de São João da Boa Vista - SP	ES	Pichotano et al., 2004
9,90*	Cães de áreas rurais de Juiz de Fora –MG	ES	Rodrigues et al., 2004
14,49	Estudo retrospectivo dos casos suspeitos de hemoparasitoses de Belo Horizonte	ES	Moreira et al., 2003
29,30	Cães atendidos no hospital veterinário da UFRPE, Recife - PE	ES	Lima et al., 2006
9,53	Cães com inclusões em leucócitos de Jaboticabal – SP	PCR	Dagnone et al., 2004
41,90	Cães com inclusões intraplaquetárias de Campo Grande - MS	PCR	Souza et al., 2004

*Prevalência de cães de área rural, ES – Esfregaço Sanguíneo, PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Conhecer aspectos epidemiológicos dos hemoparasitos de cães de zonas rurais em três microrregiões do Estado de Minas Gerais.

2.2. Específicos

- Identificar e determinar a prevalência de ectoparasitos;
- Determinar a prevalência e a incidência de infecções por hemoparasitos (*Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*), por meio de esfregaços sangüíneos e da Reação em Cadeia da Polimerase, verificando possíveis ocorrências de *Babesia gibsoni*, *Babesia canis canis*, e *Babesia canis rossi*.
- Determinar a soroprevalência e incidência de *Babesia canis vogeli* por RIFI;
- Comparar molecularmente amostras de *Babesia canis vogeli* obtidas de zonas rurais com amostras de zonas urbanas;
- Determinar a soroprevalência de *Ehrlichia canis* por RIFI;
- Avaliar fatores de risco para hemoparasitoses caninas nessas áreas rurais.

3. METODOLOGIA

3.1. Locais de realização do estudo

3.1.1. Áreas do estudo

As coletas das amostras de sangue e ectoparasitos dos cães foram realizadas em seis municípios de três diferentes macrorregiões do Estado de Minas Gerais: Carrancas (21° 48' 75" S; 44° 64' 25" W), Cruzília (21° 83' 86" S; 44° 80' 83" W) e São Vicente de Minas (21° 71' 25" S; 44° 44' 42" W), que fazem parte da macrorregião Sul de Minas, mesorregião do Campo das Vertentes, e Microrregião de Lavras; Carlos Chagas (17° 70' 31" S; 40° 76' 64" W) e Umburatiba (17° 25' 58" S; 40° 57' 28" W), que fazem parte da macrorregião Jequitinhonha/Vale do Mucuri, mesorregião Vale do Mucuri, e microrregião de Nanuque; Igarapé (20° 07' 03" S; 44° 30' 17" W), que faz parte da macrorregião Central, mesorregião metropolitana de Belo Horizonte, e microrregião de Belo Horizonte (Fig. 1) (Geominas, 2005; Assembleia Legislativa-MG, 2005).

A microrregião de Lavras apresenta um clima do tipo Tropical de altitude em uma área de transição entre o cerrado e a mata atlântica, com temperatura média anual de 19,4°C, umidade média de 76,2% e pluviometria de 1529,7 mm/ano (Brasil, 1992). As propriedades desta microrregião são tradicionalmente destinadas à pecuária leiteira, com predomínio de animais com sangue taurinos.

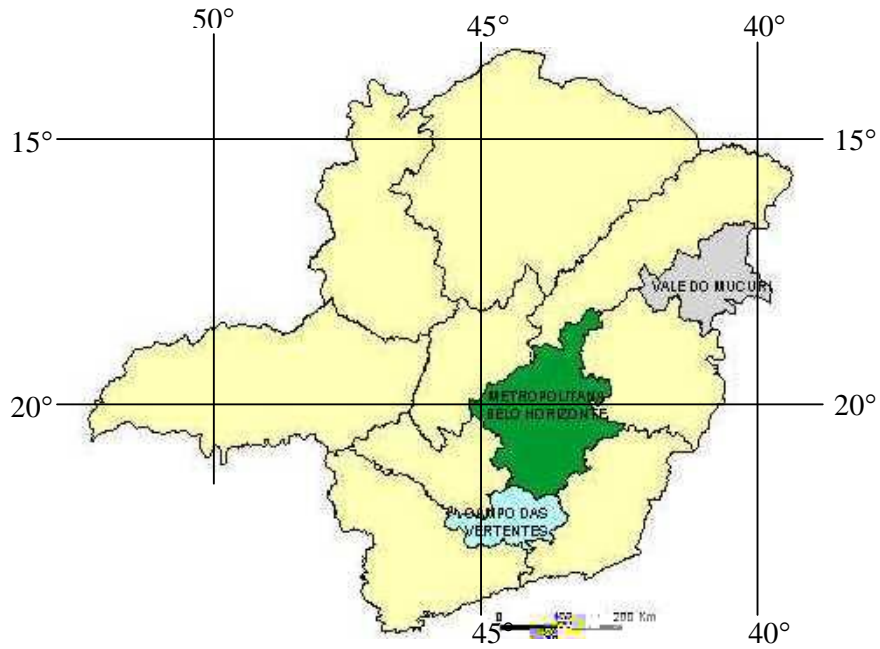


Figura 1: Mapa geopolítico de Minas Gerais – Brasil, destacando as mesorregiões das coletas.

A microrregião de Nanuque apresenta um clima do tipo Tropical úmido, com vegetação originalmente de mata atlântica, temperatura média anual de 22,4°C, umidade média de 79,0% e pluviometria de 1059,9 mm/ano (Brasil, 1992). As propriedades desta microrregião são tradicionalmente destinadas à pecuária de corte com predomínio de animais com sangue zebuínos.

A microrregião de Belo Horizonte apresenta um clima do tipo Tropical úmido, com uma vegetação originalmente de cerrado, com temperatura média anual de 21,1°C, umidade média de 76,2% e pluviometria de 1529,7 mm/ano (Brasil, 1992). O tipo de exploração das propriedades rurais nesta microrregião é bastante diverso, tendo um pequeno predomínio da horticultura.

3.1.2. Local das análises laboratoriais

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Protozoologia Veterinária, e de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), no Laboratório de Protozooses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e no Instituto de Medicina Tropical Comparada e Parasitologia (Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie) da Universidade de Ludwig Maximilian (Ludwig – Maximilian Universität) em Munique, Alemanha.

3.2. Coleta e processamento das amostras

Durante a estação seca (Abril a Setembro) do ano de 2004 foram coletadas amostras sanguíneas de 252 cães, sendo 100 cães da microrregião de Lavras, 102 cães da microrregião de Nanuque, e 50 cães da microrregião de Belo Horizonte. Os cães foram provenientes de áreas com características rurais (fazendas) e afastadas do centro urbano. As fazendas foram selecionadas de acordo com o acompanhamento de aulas práticas do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo que as fazendas em que ocorriam as aulas práticas eram consideradas como ponto sede e eram visitadas propriedades rurais próximas do ponto sede. Todos os cães encontrados nas propriedades visitadas eram amostrados.

Seis meses após a primeira coleta (Outubro a Março) correspondendo a estação chuvosa, realizou-se nova coleta sanguínea dos mesmos cães, sendo coletado 71 cães da microrregião de Lavras, 67 cães da microrregião de Nanuque, e 30 cães da microrregião de Belo Horizonte. Os cães não coletados deveram-se a vários motivos como, por exemplo, morte do animal, não encontro do animal no

momento da segunda visita, o não encontro dos donos ou responsáveis dos animais e mudança de residência dos donos.

Outras 100 amostras de sangue foram coletadas de cães dos centros urbanos, sendo 40 cães da microrregião Lavras, 40 cães da microrregião de Nanuque e 20 cães da microrregião de Belo Horizonte no período chuvoso, para comparação com os animais de áreas rurais. A escolha dos cães foi realizada de forma aleatória evitando a coleta em áreas com características que poderiam gerar dúvidas se eram urbanas ou rurais, assim foi formado um cinturão de no mínimo um km de regiões com características rurais.

3.2.1. Coleta dos ectoparasitos

No momento da coleta sangüínea todos os cães foram cuidadosamente examinados para observação dos ectoparasitos. Carrapatos, e pulgas foram coletados, conservados em álcool 70% para posterior identificação.

3.2.2. Identificação dos ectoparasitos

Os ectoparasitos foram observados em microscópio estereoscópio e os carrapatos adultos foram classificados segundo Nuttall et al. (1926), Aragão & Fonseca (1961) e Calderón (2003). As pulgas foram classificadas segundo a chave dicotômicas proposta por Linardi & Guimarães (2000).

3.2.3. Identificação dos hemoparasitos

Esfregaços sangüíneos de cada animal foram preparados com sangue capilar, obtido por punção da ponta da orelha, secos ao ar e corados pelo May Grünwald Giemsa. Os esfregaços foram observados sob microscopia óptica de

imersão, aumento de 1000X, para detectar a presença de *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *A. platys*.

3.2.4. Coleta de sangue

De cada cão foram coletados cinco mL de amostra sangüínea, em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA), por meio de punção da veia cefálica ou jugular. Desta amostra, uma alíquota de um mL de sangue foi acondicionada à temperatura de -20°C para posterior extração de DNA. Com o volume restante foi determinado o volume globular, através da técnica de microhematócrito (JAIN, 1993). Posteriormente o sangue foi centrifugado a 2000g em temperatura ambiente por cinco minutos e o plasma separado e armazenado a temperatura de -20°C .

3.2.5. Preenchimento do questionário

Após a coleta das amostras sangüíneas e ectoparasitos foi preenchido um questionário (ANEXO), visando obter informações sobre a propriedade em que os cães foram coletados, bem como também dados referente aos animais. Foram registrados dados referentes ao tipo de vegetação predominante, animais domésticos e silvestres existentes na propriedade. O questionário abrangeu também informações específicas sobre os animais amostrados como: sexo, raça, idade, pelagem, porte, alimentação, presença ou ausência de ectoparasitos e observação da mucosa palpebral no momento da coleta.

3.3. Produção de Antígenos de *Babesia canis* para imunofluorescência

3.3.1. Obtenção de animais livres de hemoparasitoses

Foram utilizados dois cães, machos, sem raça definida (SRD), com quatro meses de idade, oriundos do Canil de experimentação do Departamento de Parasitologia do ICB. Estes animais foram esplenectomizados no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG e no pós-operatório foram medicados com antibiótico (Benzilpenicilina benzatina) e antiinflamatório (Flunixin Meglumine). Diariamente, durante um período de 14 dias após a cirurgia, esfregaços sanguíneos foram preparados com sangue capilar, obtidos por punção da ponta da orelha, e posteriormente corados pelo método Panótico Rápido (LABORCLIN). Os cães foram considerados livres de infecções por hemoparasitos quando não apresentaram parasitos nos esfregaços sangüíneos e RIFI negativa (Titulo <1:40).

3.3.2. Infecção Experimental com *B. canis* e acompanhamento dos animais

Os cães foram inoculados por via endovenosa com $2,5 \times 10^6$ hemácias parasitadas com *B. canis vogeli*, cepa Lavras/UFMG mantida criopreservada em N₂ líquido na EV – UFMG.

Os animais foram acompanhados diariamente pela observação da temperatura retal e de esfregaços sangüíneos preparados com sangue capilar corados pelo método do panótico rápido. A parasitemia foi determinada, sob microscopia óptica de imersão, pela percentagem de eritrócitos parasitados observados em 100 campos microscópicos. Quando os animais apresentaram parasitemia \geq a 4%, foram colhidos dez mililitros de sangue em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA), por punção da veia jugular.

3.3.3. Preparação do Antígeno de *B. canis*

Um volume de aproximadamente 20mL de sangue coletado com anticoagulante (EDTA) dos cães infectados foi centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante e a papa de leucócitos foram descartados. As hemácias foram lavadas com PBS (pH 7,4) e novamente centrifugadas a 1000g por 10 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. No final das lavagens, foram adicionados dois volumes de PBS (pH 7,4) a papa de hemácias.

Esfregaços sangüíneos grossos foram confeccionados em lâminas de vidro que, após serem secadas ao ar, foram fixadas com acetona resfriada por 15 minutos, enroladas em lenços de papel e papel alumínio e conservadas a -20°C.

3.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *B. canis vogeli*

3.4.1. RIFI para *Babesia canis vogeli*

A RIFI foi realizada segundo técnica descrita por IICA (1987). As lâminas de antígenos foram retiradas do freezer imediatamente antes do uso, secadas a 37°C por cinco minutos, marcadas com círculos (feitos com esmalte), onde foram colocados os soros testes, o controle positivo (soro de animal sorologicamente positivo para *B. canis*), controle negativo (soro de animal sorologicamente negativo para *B. canis*), e controle PBS. Cada amostra foram testadas nas diluições de 1:40, 1:160, 1:640 e 2560.

Após a incubação a 37°C por 30 minutos, as lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos com PBS e secas à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado em cada poço conjugado anti-cão marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (FIOCRUZ / Bio-Manguinhos) diluído a 1:100 em azul de Evans (1:50, em PBS Tween). As lâminas foram incubadas novamente a 37°C por 30

minutos e posteriormente lavadas três vezes por cinco minutos com PBS. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, adicionado glicerina tamponada e cobertas com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência, aumento de 400X. Foram considerados positivos soros com títulos $\geq 1:40$.

3.4.2. RIFI para *Ehrlichia canis*

As amostras de plasma da estação seca foram submetidas à análise por RIFI para o diagnóstico sorológico de *E. canis*. O teste foi realizado usando o kit MegaScreen fluoehrlichia canis kit (MegaCor, GmbH), nas diluições de 1:40, 1:160, 1:640 e 2560 de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência, aumento de 400X. Foram considerados positivo soros com títulos $\geq 1:40$.

3.5. Reação em cadeia da Polimerase (PCR convencional e PCR em tempo real)

3.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada empregando-se o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo-se as recomendações do fabricante para extração de DNA de 300 μ l de sangue.

3.5.2. Dosagem do DNA

O DNA extraído foi dosado no espectrofotômetro nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen, Alemanha) e posteriormente diluído para uma concentração final de 50ng/ μ l.

3.5.3. PCR em Tempo Real

As amplificações de DNA por meio da PCR em tempo real das subespécies de *B. canis*, *E. canis*, e *A. platys* foram realizadas no Instituto de Medicina Tropical Comparada e Parasitologia (Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie) da Universidade Ludwig Maximilian (Ludwig – Maximilian Universität) em Munique, Alemanha.

3.5.3.A. Amplificação do DNA de subespécies de *B. canis*

As amplificações do fragmento do gene ITS2 das subespécies de *B. canis* foram realizadas de acordo com Zahler (2004, comunicação pessoal), onde duas diferentes reações de PCR em tempo real foram feitas.

A primeira reação foi realizada utilizando os iniciadores BC-1, BC-2, BC-4 e BC-6 (Tabela 5), os quais amplificaram um fragmento específico para *B. canis canis* ou *B. canis rossi*. Nesta reação foram utilizadas três sondas diferentes, uma específica para a subespécie *B. canis canis* (BC-S1) marcada na extremidade 5' com o corante repórter 6-FAM, e na extremidade 3' com o corante silenciador Dabcyl. As outras duas sondas são específicas para a subespécie *B. canis rossi* (BR-S3 e BR-S4) marcada na extremidade 5' com o corante repórter Quasar 670 (sin. Cy5) e na extremidade 3' com o corante silenciador BHQ-3 (Tab. 5).

A outra reação foi realizada para amplificação de um fragmento da região ITS2 específico de *B. canis vogeli*. Nesta reação foram utilizados os iniciadores (BC-2 e BC-3) e a sonda BV-S2 marcada na extremidade 5' com o corante repórter HEX, e na extremidade 3' com o corante silenciador Dabcyl.

As reações foram processadas adicionando-se cinco μ l (250ng) do DNA extraído a 2mM Tris·HCl; 10mM KCl; 0,1mM DTT; 0,01mM EDTA; 0,05% Nonidet®

P-40; 0,05% Tween® 20; 5% glycerol; 8mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1μM de cada iniciador (Thermo electron, Dreieich, Alemanha), 0,2μM de cada sonda (Thermo electron), 200μM de cada dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha), 1,25U de HotStart Taq DNA Polymerase (Qiagen) e água ultra pura estéril para um volume final de 25μl.

Como controle positivo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de animais naturalmente infectados com *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli*. Como controle negativo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de animais sabidamente negativos.

O material foi incubado em termociclador icycler (Bio-Rad, Munique, Alemanha), empregando-se a seguinte seqüência de ciclos:

1. Desnaturação e ativação da Taq: 95°C por 13 minutos;
2. Desnaturação: 95°C por 30 segundos;
3. Anelamento: 50°C por 30 segundos;
4. Extensão: 72°C por 30 segundos.

Após estas etapas iniciais seguiram 50 ciclos com os passos 2, 3, e 4. A análise foi realizada com o auxílio do programa icycler (Bio-Rad).

3.5.3.B. Amplificação do DNA de *Ehrlichia canis*.

As amplificações de DNA de *E. canis* foram realizadas por meio de PCR em tempo real utilizando os iniciadores ECP-1 e ECP-2, e a sonda ECP-S1 (Tab. 4 e 5) conforme descrito por Zahler (2004, dados não publicados).

As reações foram processadas de acordo como descrito no item 3.5.2.A, excetuando os seguintes reagentes: 5mM MgCl₂ (Qiagen), 0,25μM da sonda

(Thermo electron), 100 μ M de cada dNTP (Fermentas) e 0,625U de HotStart Taq DNA Polymerase (Qiagen).

Como controle positivo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de animais naturalmente infectados com *E. canis*. Como controle negativo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de cães sabidamente negativos.

O material foi incubado em termociclador icycler (Bio-Rad, Munique, Alemanha), empregando-se a seguinte seqüência de ciclos:

1. Desnaturação e ativação da Taq: 95°C por 8 minutos;
2. Desnaturação: 95°C por 30 segundos;
3. Anelamento: 57°C por 30 segundos;
4. Extensão: 72°C por 30 segundos.

Após estas etapas iniciais seguiram 50 ciclos com os passos 2, 3, e 4. A análise foi realizada com o auxílio do programa icycler (Bio-Rad).

3.5.3.C. Amplificação do DNA de *Anaplasma platys*

As amplificações do fragmento do gene 16S do rDNA de *A. platys* foram realizadas por meio de PCR em tempo real utilizando os iniciadores Eplat-19f e Eplat-117r e a sonda Eplat-55p (Tab. 4 e 5), conforme descrito por Teglas et al. (2005).

As reações foram processadas de acordo como descrito no item 3.5.2.A, excetuando os seguintes reagentes: 5mM MgCl₂ (Qiagen), 0,4 μ M de cada iniciador (Thermo electron) e 0,08 μ M da sonda (Thermo electron).

Como controle positivo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de cães naturalmente infectados com *A. platys*. Como controle negativo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de cães sabidamente negativos.

O material foi incubado em termociclador icycler (Bio-Rad), empregando-se a seguinte seqüência de ciclos:

1. Desnaturação e ativação da Taq: 95°C por 10 minutos;
2. Desnaturação: 95°C por 15 segundos;
3. Anelamento e extensão: 60°C por 60 segundos;

Após estas etapas iniciais seguiram 50 ciclos com os passos 2 e 3. A análise foi realizada com o auxílio do programa icycler (Bio-Rad).

3.5.4. PCR Convencional

As amplificações de DNA de *B. gibsoni* foram realizadas no Instituto de Medicina Tropical Comparada e Parasitologia (Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie) da Universidade de Ludwig Maximilian (Ludwig – Maximilian Universität) em Munique, Alemanha.

3.5.4.A. Amplificação do DNA de *Babesia gibsoni*

Para amplificação do DNA de *B. gibsoni* foi realizada uma Semi Nested PCR com os iniciadores 455-479F e 793-772R na primeira reação e os iniciadores BgibAsia-F e 793-772R (Tab. 04) na segunda reação (Birkenheuer et al., 2003), que amplificam um fragmento de 180 pb do gene 18S rDNA.

3.5.4.A.1. Amplificação do DNA de *Babesia gibsoni* através da PCR

As reações de PCR foram processadas de acordo com Birkenheuer et al. (2003), adicionando-se 2,5µl (125ng) do DNA extraído a 2mM Tris·Cl; 10mM KCl; 0,1mM DTT; 0,01mM EDTA; 0,05% Nonidet® P-40; 0,05% Tween® 20; 5% glycerol; 1,5mM MgCl₂ (Qiagen), 1,0µM de cada iniciador (Thermo electron), 200µM de cada

dNTP (Fermentas), 0,625U de HotStart Taq DNA Polymerase (Qiagen) e água ultra pura estéril para um volume final de 25 μ l.

Como controle positivo foi utilizado o DNA previamente extraído de sangue de animais naturalmente infectados com *B. gibsoni*. Como controle negativo foi utilizado DNA previamente extraído de sangue de cães sabidamente negativos.

O material foi incubado em termociclador icycler (Bio-Rad), empregando-se a seguinte seqüência de ciclos:

1. Desnaturação e ativação da Taq: 95°C por 13 minutos;
2. Desnaturação: 95°C por 45 segundos;
3. Anelamento: 58°C por 45 segundos;
4. Extensão: 72°C por 45 segundos;

Após estas etapas iniciais seguiram 50 ciclos (passos 2, 3 e 4), com uma extensão final a 72°C por cinco minutos.

3.5.4.A.2. Amplificação do DNA de *Babesia gibsoni* através da semi Nested PCR

As reações de Semi Nested PCR foram processadas utilizando-se 0,5 μ l do produto amplificado na PCR e 49,5 μ l da solução descrita no item 3.5.3.A.1, sendo substituído somente o iniciador 455-479F pelo BgibAsia-F. A seqüência dos ciclos foi semelhante ao da PCR, excetuando a quantidade de ciclos que passou a ser 30.

Os produtos das reações da Semi Nested PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, em tampão TAE (0,5X). Foram aplicados 15 μ l do produto da amplificação e três μ l de tampão da amostra 6X por canaleta do gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado 100 pb GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 volts, por

aproximadamente 30 minutos, corado com uma solução de brometo de etídio por 15 minutos e observado sob lâmpada UV.

TABELA 4: Seqüência dos iniciadores utilizados nas PCRs.

Hemoparasito	Iniciadores	Seqüência cinco' – 3'	Referência
<i>Babesia canis</i>	BC-1	TGT GTA CTT GTT ACC GAA TCT TC	Zahler, 2004 (dados não publicados)
	BC-2	TGC TTA AAT TCA GCG GAT AG	
	BC-3	TGT GTA TGT GAT ACC GAA TCT TC	
	BC-4	GCT TAA ATT CGG CGG ATA G	
	BC-6	CTT AAA TTC GGC GGA TCC	
	RIB-19	CGG GAT CCA ACC TGG TTG ATC CTG C	
<i>Ehrlichia canis</i>	RIB-20	CCG AAT TCC TTG TTA CGA CTT CTC	Zahler et al., 2000
	ECP-1	AGT TAC CCT ATC ACA CCA GAA GTC	
<i>Anaplasma platys</i>	ECP-2	CGT CAA GAG TTA CTG AAG CAG ATG	Teglas et al., 2005
	Eplat-19f	CGG ATT TTT GTC GTA GCT TGC TAT	
	Eplat-117r	CCA TTT CTA GTG GCT ATC CCA TAC TAC T	
<i>Babesia gibsoni</i>	455-479- F	GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG TGA C	Birkenheuer et al., 2003
	793-772- R	ATG CCC CCA ACC GTT CCT ATT A	
	BgibAsia- F	ACT CGG CTA CTT GCC TTG TC	

TABELA 5: Seqüência das sondas utilizadas nas PCRs em tempo real.

Hemoparasito	Iniciadores	Seqüência cinco' – 3'	Referência
<i>Babesia canis</i>	BC-S1	6-FAM CGCGATGGCGTTGCCCCGAGACTGTGATCGCG Dabcyl	Zahler 2004 (dados não publicados)
	BV-S2	HEX CGCGATGTGAGCCGTCTGACTCCGTGTATCGCG Dabcyl	
	BR-S3	BHQ-3 CGCGAGACGCTGTATGGTTGTGGATGATCGCG Quasar 670 (Cy5)	
	BR-S4	BHQ-3 CGCGATGAGCTTGCAACCACAACCATATAAATCGCG Quasar 670 (Cy5)	
<i>Ehrlichia canis</i>	ECP-S1	6-FAM CGCGATCTACTACAGGAGTTATTACAGGTATCTTCTCGATCGCG Dabcyl	
<i>Anaplasma platys</i>	Eplat-55p	6-FAM TGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGA BH1	Teglas et al., 2005

3.6. Sequenciamento de *Babesia canis vogeli*

Foram selecionadas amostras positivas para *B. canis vogeli* na PCR em tempo real de cada região de zona rural. As amostras foram seqüenciadas utilizando os iniciadores RIB-19F, RIB-20R, 455-479-F e 793-772-R em diferentes combinações (RIB-19F e RIB-20R; 455-479-F e 793-772-R; RIB-19F e 793-772-R; 455-479-F e RIB-20R), que são responsáveis por amplificar entre 350 e 1200 pb do gene 18S do rDNA.

As reações foram realizadas utilizando 2,0 µl (100 ng) do DNA extraído a dois mM Tris·Cl; 10mM KCl; 0,1mM DTT; 0,01mM EDTA; 0,05% Nonidet® P-40; 0,05% Tween® 20; 5% glycerol; 2,5mM MgCl₂ (Qiagen), 1,0µM de cada iniciador (Thermo electron), 200µM de cada dNTP (Fermentas), 1,25U de HotStart Taq DNA Polymerase (Qiagen) e água ultra pura estéril para um volume final de 25µl.

O material foi incubado em termociclador icycler (Bio-Rad), empregando-se a seguinte seqüência de ciclos:

1. Desnaturação e ativação da Taq: 95°C por 13 minutos;
2. Desnaturação: 95°C por 1 minuto;
3. Anelamento: 54°C por 1 minuto;
4. Extensão: 72°C por 1,5 minutos;

Após estas etapas iniciais seguiram 30 ciclos (passos 2, 3 e 4), com uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Os produtos das reações da Semi Nested PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, em tampão TAE (0,5X). Foram aplicados 15 µl do produto da amplificação e três µl de tampão da amostra 6X por canaleta do gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado 100 pb GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 volts, por

aproximadamente 30 minutos, corado com uma solução de brometo de etídio por 15 minutos e observado sob lâmpada UV.

As bandas específicas foram recortadas do gel e extraídas o DNA utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). O DNA foi precipitado utilizando Acetato de Amônio e enviado para MWGAG Biotech (Ebersberg, Alemanha) para o sequenciamento.

3.6.1. Análise das seqüências

As seqüências de *B. canis vogeli* obtidas de cada área rural foram comparadas através de alinhamentos com as seqüências de *B. canis vogeli* do Brasil (acesso no GenBank numero AY371194, AY371195, AY371196), França (AY072925), Egito 1 (AY371197), Egito 2 (AJ009796), Estados Unidos (AY371198), Espanha (AY150061), Japão (AB083374), Austrália (AY102163) e África do Sul (AF548006) utilizando o programa Clustal W do Instituto Europeu de Bioinformática disponível no sitio <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw>, erros de alinhamentos foram consertados manualmente e realinhados quando necessários. A busca de identidade foi realizada utilizando-se o programa Blastn disponível no sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Altschul et. al., 1990).

3.7. Análise Estatística

Os resultados das RIFIs e PCRs foram consideradas variáveis dependentes e sexo, idade, presença ou ausência de carrapatos e volume globular as idenpendentes, a associação entre as variáveis foi testada pelo Qui-Quadrado e as “Odds Ratio” foram calculadas para cada variável separadamente usando o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003). A regressão logística múltipla foi feita

com as variáveis com valores de $P < 0,20$ na análise univariada usando o programa Minitab 14 for Windows.

4. Resultados

Parte dos resultados encontra-se em três artigos científicos, sendo um já aceito (apresentado no item 4.1), o segundo aguardando aceite após modificações (apresentado no item 4.2), e o terceiro em fase final de elaboração para breve submissão (apresentado no item 4.3). Os demais resultados são apresentados e discutidos no item 4.4.

4.1 - Factors influencing the epidemiology of canine ehrlichiosis in rural areas of the state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Journal* (in press).

4.2 – Factors associated with seroprevalence of canine babesiosis in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil. *Research Veterinary Science* (aguardando aceite).

4.3 - Development and validation of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis* in endemic regions. (Em fase final de preparação)



Short communication

Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil

Livio Martins Costa Jr ^a, Karin Rembeck ^b, Múcio Flávio Barbosa Ribeiro ^a,
Pamela Beelitz ^b, Kurt Pfister ^b, Lygia Maria Friche Passos ^{c,*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^b Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig Maximilian University, München, Germany

^c Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 567-Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 30.123-970, Brazil

Accepted 1 November 2006

Abstract

Ehrlichia canis has a worldwide geographic distribution, occurring particularly in tropical and subtropical areas. In Brazil, the main vector in urban areas is believed to be the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*, but little is known about the occurrence, transmission and other epidemiological aspects of canine ehrlichiosis in rural areas, where *Amblyomma* ticks are found more frequently than *R. sanguineus*. A sero-prevalence study of canine ehrlichiosis was carried out in three distinct rural regions of the State of Minas Gerais, Brazil. Serum samples were collected from 226 dogs living on farms in Lavras ($n = 85$), Belo Horizonte ($n = 45$), and Nanuque ($n = 96$) and were analyzed by an indirect fluorescent antibody test for the detection of anti-*Ehrlichia canis* antibodies. Age, breed, sex, presence of ticks and packed cell volume were also recorded. There were 65.6% positive dogs in Nanuque, 37.8% in Belo Horizonte, and 24.7% in Lavras. Animals living in Nanuque were 4.6 times more likely to be serologically positive than dogs living in the other two regions and antibody titres were considerable higher in this area. Male dogs, dogs >5 years of age, those infested with ticks, and mongrels all showed higher rates of positivity. The results point to the importance of canine ehrlichiosis in rural areas and indicate the need for further studies on natural transmission and maintenance of the disease.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Ehrlichia canis*; Ticks; Epidemiology; Brazil

Ehrlichia canis, the causal agent of canine ehrlichiosis, has a wide geographic distribution, and is endemic in many different tropical and subtropical areas (Keefe et al., 1982). In Brazil, the main vector in urban areas is believed to be the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. However, little is known about the occurrence, transmission and other epidemiological aspects of canine ehrlichiosis in rural areas, where *Amblyomma* ticks are found more frequently than *R. sanguineus* (O'Dwyer, 2000; Labruna and Pereira, 2001).

Based on examination of blood smears, two studies in Brazil have reported prevalences of 4.8% and 5.9% for dogs living in rural areas of the States of Rio de Janeiro and Minas Gerais, respectively (O'Dwyer, 2000; Rodrigues et al., 2004). *Ehrlichia* epidemiological data are however lacking and the aim of the present study was to determine sero-prevalence and the factors potentially associated with a positive antibody response to *E. canis* in dogs living in farms located in three distinct regions in the State of Minas Gerais, Brazil.

From June to August 2004, blood samples were collected randomly from 226 dogs living in rural areas within Lavras ($n = 85$), Belo Horizonte ($n = 45$), and Nanuque

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34992057; fax: +55 31 34992080.
E-mail address: lygia@vet.ufmg.br (L.M.F. Passos).

Table 1
Climatic data of the regions of Lavras, Belo Horizonte and Nanuque, Minas Gerais State – Brazil

Parameter/location	Lavras	Belo Horizonte	Nanuque
Latitude–south	21°48'	20°07'	17°70'
Longitude–west	44°64'	44°30'	40°76'
Altitude (m)	1060	780	159
Mean temperature (°C)	19.2	21.8	22.4
Relative humidity (%)	76.2	76.2	79.0
Annual rainfall (mm)	1470	1272	1059

Source: <http://www.almg.gov.br/munmg>.

($n = 96$), all in Minas Gerais (Fig. 1). The climatic and geographic data for each location are shown in Table 1. For each sample, the packed cell volume (PCV) was determined and the plasma was analyzed using an indirect fluorescent antibody test (IFAT) (MegaScreen *Fluoehrlichia canis* Kit, MegaCor) at dilutions of 1:40, 1:160, 1:640 and 2:560, according to the manufacturer's instructions.

In all animals, the presence of ticks, age, sex and breed were recorded. Ticks were collected and conserved in 70% alcohol for identification according to Aragão and Fonseca (1961).

The results were analyzed by $2 \times K$ contingency tables of exposure variables. The outcome variable was seropositivity to *E. canis* and the independent variables were: age (<2, 2–5, >5 years old), sex (male, female), tick (presence or absence), species of tick (*Amblyomma cajennense*, *R. sanguineus*), breed (mongrel dogs or other breeds), and PCV (below or above 30%). Odds ratios (OR), 95% confidence interval (CI) and P values were calculated separately for each variable using the BioEstat software (Ayres et al., 2003). The Chi-square test was used to evaluate associa-

tions between antibody titre and region, and presence or absence of ticks.

A total of 101/226 (44.7%) dogs were found to be seropositive to *E. canis*. Prevalences in Nanuque, Belo Horizonte and Lavras were 65.6%, 37.8% and 24.7%, respectively. Male dogs >2 years of age and those infested with ticks were highly associated with seropositivity to *E. canis* (Table 2).

Animals living in the Nanuque region were 4.6 times (CI = 2.6–8.1; $P < 0.01$) more likely to be seropositive to *E. canis* than dogs living in the other two regions. The dogs in this area also showed the highest percentage of tick infestations (75.0%), compared with Lavras (21.2%) ($P \leq 0.05$) and Belo Horizonte (37.8%) ($P \leq 0.10$).

A. cajennense was the most prevalent tick species infesting the dogs, with an overall infestation rate of 40.3%; next was *R. sanguineus* (19.0%), *Boophilus microplus* (3.1%) and *Amblyomma tigrinum* (1.8%). The *Amblyomma* infestation rate was higher in Nanuque (65.6%) ($P \leq 0.01$) than in Belo Horizonte (35.6%) or Lavras (14.1%). Animals infested with *A. cajennense* and *R. sanguineus* were 2.3 (CI = 1.4–4.0; $P \leq 0.01$) and 2.2 times (CI = 1.1–4.3; $P \leq 0.05$) more likely to be seropositive to *E. canis* than other dogs.

The highest *E. canis* prevalence was also seen within the region of Nanuque, in dogs >5 years of age (95.0%), in males (70.0%), those that were tick infested (68.1%), in mongrels (67.9%), and where PCV >30 (68.3%). However, the OR was significantly different only with regard to the ages ranging from 2 to 5 years (OR = 4.1; CI = 1.2–14.9; $P \leq 0.01$) and >5 years (OR = 20.5; CI = 2.5–41.4; $P \leq 0.01$). The lowest prevalence was seen in the region

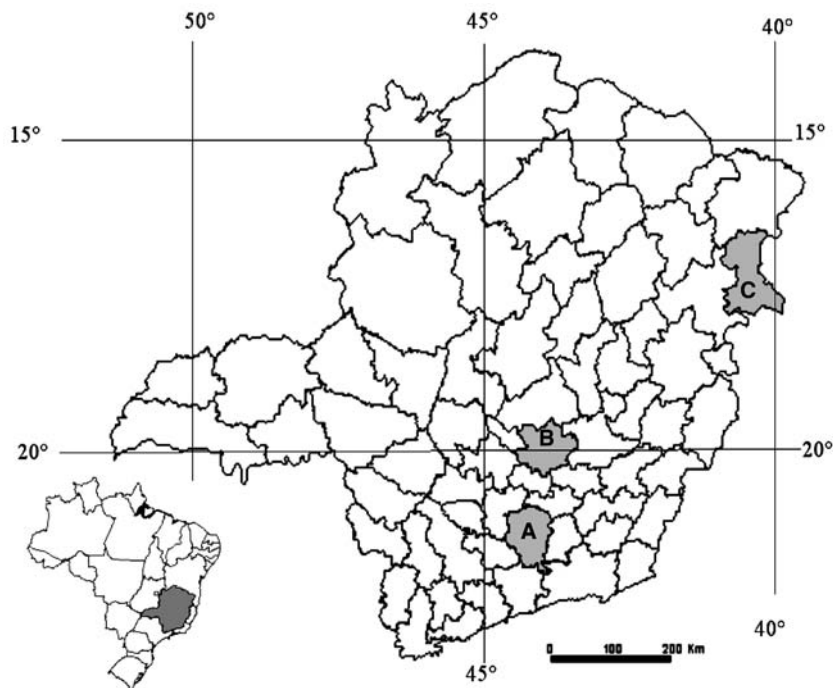


Fig. 1. Geographic location of the regions studied within the State of Minas Gerais, Brazil: A, Lavras; B, Belo Horizonte; and C, Nanuque.

Table 2
Sero-prevalence of canine ehrlichiosis within each variable studied in rural areas of Minas Gerais, Brazil, 2004

Variable	Canine ehrlichiosis			
	% Sero-prevalence (+/n)	OR	95% CI	P-value
Age (Years)				
<2	33.6 (39/116)	Ref.		
2–5	52.7 (29/55)	2.2	1.2–4.6	0.020*
>5	60.0 (33/55)	3.0	1.5–5.7	0.001*
Sex				
Male	50.6 (86/170)	2.8	1.4–5.4	0.001*
Female	26.8 (15/56)	Ref.		
Ticks ^a				
Yes	54.2 (58/107)	2.1	1.2–3.5	0.001*
No	36.1 (43/119)	Ref.		
Breed				
Mongrel	50.6 (89/176)	3.2	1.6–6.6	0.001*
Others	24.0 (12/50)	Ref.		
PCV (%)				
<30	43.6 (17/39)	0.9	0.5–1.9	0.980
>30	44.9 (84/187)	Ref.		

+, Number of positive animals; n, number of samples per variable; OR, odds ratios; 95% CI, 95% confidence interval; P, value probability; Ref., variable used as a reference value; * $P < 0.05$.

^a Ticks observed during blood collection.

of Lavras, with a similar correlational pattern among the variables.

The analyses of serological data showed that the frequency of titres followed a normal curve, however the highest frequencies of titres 1:640 ($P \leq 0.01$) and 1:2560 ($P \leq 0.01$) were observed in animals living in Nanuque and in Belo Horizonte (1:640, $P \leq 0.01$) (Fig. 2).

The prevalence of canine ehrlichiosis varies as a function of climatic conditions (Keefe et al., 1982), due to certain epidemiological factors, such as the distribution of the vector, animal behaviour, the age range of the studied population (Rodriguez-Vivas et al., 2005), and management practices and habitat where the animals live (Sainz et al., 1996). In the present study, the overall *E. canis* prevalence in dogs living in rural areas was 44.7%, which is much higher than that reported for animals living in urban and suburban areas in South Brazil (23%) (Trapp et al.,

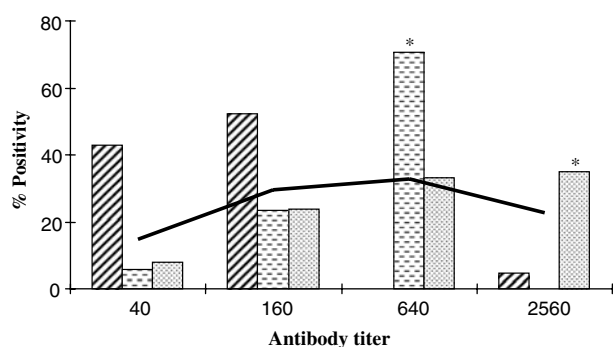


Fig. 2. Frequency of antibody titers against *Ehrlichia canis* in dogs living in farms in Lavras (▨), Belo Horizonte (▤) and Nanuque (▥), and the mean (—) in the State of Minas Gerais, Brazil, 2004. * $P < 0.05$

2006). The results suggest that dogs living in rural areas are more exposed to tick vectors than those living in urban areas and might be associated with the fact that urban dogs are more likely to be sprayed with acaricides, while rural dogs are scavengers and are rarely sprayed.

In the present study, infestations with *A. cajennense* were much higher (40.3%) than infestations with other tick species, and this result is in agreement with the findings reported by Labruna and Pereira (2001). It therefore seems possible that in rural areas, other species of ticks apart from *R. sanguineus*, may act as vectors of *E. canis*.

Johnson et al. (1998) suggested that as *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis* are genetically and antigenically closely related, both species could utilize similar tick vectors for transmission of pathogens to susceptible hosts. *E. chaffeensis* is successfully transmitted to dogs by *Amblyomma americanum* (Ewing et al., 1995). Based on the results of the present study, *A. cajennense* ticks should be included as a potential vector of *E. canis* in rural areas of Brazil (OR = 2.3, CI = 1.4–4.0; $P \leq 0.01$), but this still remains to be investigated.

We found high associations between age and *E. canis* seropositivity (2–5 years: OR = 2.20, CI = 1.2–4.6, $P \leq 0.05$; >5 years: OR = 2.96, CI = 1.5–5.7, $P \leq 0.01$). Several other workers have also demonstrated this association (Watanabe et al., 2004; Rodriguez-Vivas et al., 2005), which can be attributed to the increased probability of a dog being exposed to *E. canis* as it gets older, rather than to a higher susceptibility among older dogs.

Other studies have shown no association between seroprevalence of *E. canis* infection and sex or breed (Watanabe et al., 2004; Rodriguez-Vivas et al., 2005). In rural areas of Minas Gerais State, male mongrel dogs were highly associated with *E. canis* seropositivity. In these areas, mongrels are preferred on farms because they help with routine work with cattle and other production animals; as a consequence, they are more exposed to the tick vectors. Sainz et al. (1996) reported no differences between breeds, however they did find an association between the occupation of the dog (guard or guide dogs) and seropositivity to *E. canis*.

In the present study, no correlation was observed between positivity and low PCV (<30%) (OR = 0.95, CI = 0.5–1.9, $P \geq 0.05$). A high frequency of tick-borne disease is expected in dogs that are more exposed to arthropod vectors (Moreira et al., 2003). This was confirmed by the high association between *E. canis* seropositivity and tick infestation at the moment of blood collection (OR = 2.1, CI = 1.2–3.5, $P \leq 0.01$).

Climatic conditions also represent an important factor influencing the dynamics of tick populations. In temperatures <17 °C, ticks show a delay in oviposition, with an interference of egg eclosion and an increased parasitic phase, which results in reduction of the number of generations produced within a year (Sonenshine, 1993). Lavras, where the lowest annual mean temperature was registered, had the lowest percentage of tick infested animals (21.2%),

the lowest sero-prevalence (24.7%) and the lowest levels of *E. canis* antibodies. In contrast, Nanuque, in which the optimal temperature for the development of the tick was observed throughout most of the year, showed the highest percentage of infested animals (75.0%), the highest sero-prevalence (65.6%) and the highest titers of antibodies against *E. canis*. Thus, dogs living in the Nanuque region had 4.6 times ($P \leq 0.01$) higher risk of being seropositive to *E. canis*, when compared to dogs living in the other two regions.

Future epidemiological studies should incorporate molecular techniques to determine other infecting *Ehrlichia* species by DNA analysis at the time of sample collection.

Acknowledgement

The authors thank CAPES (Brazil) and the DAAD (Germany) for the partial financial support given for this project.

References

- Aragão, H., Fonseca, F., 1961. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 59, 115–129.
- Ayres, M., Ayres Jr., M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S. dos, 2003. BioEstat aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. CNPq/Wild life conservation society, Brazil/United States. 291 pp.
- Ewing, S.A., Dawson, J.E., Kocan, A.A., Barker, R.W., Warner, C.K., Panciera, R.J., et al., 1995. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology 32, 368–374.
- Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W., Kocan, K.M., 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermaacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology 74, 277–288.
- Keefe, T.J., Holland, C.L., Salyer, P.E., Ristic, M., 1982. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the United States. Journal of American Veterinary Association 181, 236–238.
- Labruna, M.B., Pereira, M.C., 2001. Carrapatos em cães do Brasil. Clinica Veterinária 30, 24–32.
- Moreira, S.M., Bastos, C.V., Araújo, R.B., Santos, M., Passos, L.M.F., 2003. Retrospective study (1998–2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia 55, 141–147.
- O'Dwyer, L.H., 2000. Diagnóstico de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes de áreas rurais procedentes de três mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, Brasil. PhD Thesis. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Seropédica (RJ), Brazil.
- Rodrigues, D., Daemon, E., Rodrigues, A.F.S.F., Feliciano, E.A., Soares, A.O., Souza, A.D., 2004. Levantamento de hemoparasitos em cães da área rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 13 (Suppl. 1), 371.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Albornoz, R.E.F., Bolio, G.M.E., 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. Veterinary Parasitology 127, 75–79.
- Sainz, A., Delgado, S., Amusatogui, I., Tesouro, M., Cármenes, P., 1996. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain). Preventive Veterinary Medicine 29, 1–7.
- Sonenshine, D.E., 1993. Ecology, behavior, and host-parasite interactions. In: Sonenshine, D.E. (Ed.), Biology of Ticks, vol. 2. Oxford University Press, New York, USA, pp. 3–104.
- Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., Morais, H.S.A., 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. Veterinary Parasitology 140, 223–230.
- Watanabe, M., Okuda, M., Tsuji, M., Inokuma, H., 2004. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. Veterinary Parasitology 124, 101–107.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

**Factors associated with seroprevalence of canine babesiosis caused by *Babesia vogeli*
in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil.**

L.M. COSTA-JÚNIOR^{1,2}, M.F.B. RIBEIRO¹, K. REMBECK³, E.M.L. RABELO¹, M.
ZAHLER-RINDER³, J. HIRZMANN³, K. PFISTER³, L.M.F. PASSOS^{3,4}*

1- Departamento de Parasitologia, ICB – UFMG, Minas Gerais, Brazil

2- Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, CCAA – UFMA, Maranhão, Brazil

3- Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig Maximilian
University, Munich, Germany

4- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária – UFMG,
Minas Gerais, Brazil

* Corresponding author: Tel.: +49 89 21803514 Fax.: +49 89 21803622

E-mail address: lygia@vet.ufmg.br (L.M.F. Passos)

1 **Abstract**

2 This epidemiological survey on canine babesiosis was carried out in three distinct
3 rural regions (Lavras, Belo Horizonte and Nanuque) of the State of Minas Gerais, Brazil.
4 Ticks and blood samples were collected during a dry season (Lavras, n=92; Belo Horizonte,
5 n=50; Nanuque, n=102) and a raining season (Lavras, n=71; Belo Horizonte, n=28;
6 Nanuque, n=66) from dogs living in farms. Plasma samples were analyzed by the Indirect
7 Fluorescent Antibody Test (IFAT) for detection of anti-*Babesia vogeli* antibodies. DNA
8 was extracted from serologically positive dogs and molecular characterization of *Babesia*
9 species was performed. *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* and *Boophilus*
10 *microplus* were the tick species identified in all regions. In Lavras, in addition to those tick
11 species, *A. tigrinum* and *A. ovale* were also identified. The most prevalent tick species was
12 *A. cajennense* (35.3%), followed by *R. sanguineus* (19%) and *B. microplus* (4.0%). Dogs
13 living in Nanuque region were more infested by ticks than dogs living in Belo Horizonte
14 and Lavras regions. The overall frequency of anti-*B.vogeli* antibodies in the canine
15 population in rural areas of Minas Gerais was 28.7%, with prevalence rates of 49.0% in
16 Nanuque, 34.0% in Belo Horizonte and 3.3% in Lavras. The age of the animals and tick
17 infestation were factors associated with seroprevalence of *Babesia vogeli*. The analysis of
18 sequences showed that *B. vogeli* was the only species present in all three regions. This
19 study showed different rates of prevalence and incidence of canine babesiosis among the
20 three rural regions of Minas Gerais State. The results point to the importance of canine
21 babesiosis in rural areas and to the need of further studies related to its transmission and
22 maintenance in nature.

23

24 Key words: canine babesiosis, *Babesia vogeli*, seroepidemiology, Brazil

1

2 INTRODUCTION

3 Canine babesiosis is a tick-borne disease of domestic and wild canidae characterized
4 by fever, depression and anemia (Kuttler, 1988). Previous studies carried out in Brazil have
5 shown that babesiosis due to *Babesia canis* is commonly distributed with rates of
6 seropositivity as high as 66.9%, as reported by Ribeiro *et al* (1990) in a survey at a
7 veterinary hospital in Minas Gerais State.

8 The main vector in urban areas is believed to be the brown dog tick *Rhipicephalus*
9 *sanguineus* (Shaw *et al.*, 2001). However, little is known about the occurrence,
10 transmission and other epidemiological aspects of canine babesiosis in rural and wild areas
11 of Brazil, where *Amblyomma* ticks are most frequently found than *R. sanguineus* (Labruna
12 & Pereira, 2001), although no transmission by *Amblyomma* ticks has been reported.

13 Previous molecular studies carried out with samples from Brazilian infected urban
14 dogs have shown that *Babesia vogeli* was the etiological agent involved in all cases (Passos
15 *et al.*, 2005). And only very recently few cases of *Babesia gibsoni* infections have been
16 molecularly characterized in dogs in Brazil (Trapp *et al.*, 2006). Although studies on canine
17 babesiosis have increased over the last years in urban areas of the State of Minas Gerais
18 (Bastos *et al*, 2004; Passos *et al.*, 2005), no information is available regarding prevalence
19 rates and the species involved in rural areas. Considering that climatic and geographic
20 conditions may play an important role on transmission of tick-borne pathogens, these
21 parameters should be taken into consideration (Friedhoff, 1988). Usually, the diagnosis is
22 made upon size and morphological appearance of the intra-erythrocytic forms in peripheral
23 blood smears. However, as parasitaemia are usually very low or the parasite is not

1 detectable in blood smears, serodiagnostic methods are preferable for epidemiological
2 studies (Levy *et al*, 1987).

3 The aim of the present study was to determine the seroprevalence, the incidence and
4 the factors associated with *Babesia* infections in dogs living in three climatic distinct rural
5 areas within the state of Minas Gerais, Brazil, during a dry and a raining seasons. In
6 addition, blood samples were used to characterize with molecular methods the *Babesia*
7 species present in each region.

8

9 **MATERIALS AND METHODS**

10 **Location and climatic conditions**

11 The study was carried out in rural areas of three regions within the State of Minas
12 Gerais State, Brazil: Lavras (latitude–S 21°20'; longitude–W 45°00'), Belo Horizonte
13 (latitude–S 19°55'; longitude–W 43°56') and Nanuque (latitude–S 17°49'; longitude–W
14 40°20'). In these areas two seasons are well defined during the year: a dry season (from
15 April to September) and a raining season (from October to March). Belo Horizonte and
16 Lavras have both a high-altitude tropical climate (elevation 850 to 900 m above sea level),
17 corresponding to class Cwa (Köppen classification), whereas Nanuque has a tropical humid
18 weather (altitude around 300 m above sea level), class Aw (Köppen classification). The
19 climatic data, as referred in <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb?uf=MG>,
20 were obtained throughout the experimental period and the means were calculated.

21

22 **Sampling procedure**

23 During the dry season of 2004, ticks and blood samples were collected from dogs
24 living in farms as follows: Lavras (n=92), Belo Horizonte (n=50) and Nanuque (n=102). In

1 the subsequent raining season, the same dogs were supposed to be re-sampled; however,
2 some of the dogs had either died, or been transferred to another farm or were missing and,
3 therefore, the following numbers of dogs were re-sampled in each region: Lavras (n=71),
4 Belo Horizonte (n=28) and Nanuque (n=66). Samples were collected randomly in farms in
5 each region and the number of dogs to be sampled was calculated based on an estimated
6 prevalence of 45%, determined in a preliminary study in the Nanuque region, with a
7 confidence interval of 95% and an error margin of 15% (Centro Panamericano de Zoonosis,
8 1973).

9 Ticks were placed into tubes containing 70% alcohol and were identified according
10 to Nuttall *et al* (1926) and Aragão & Fonseca (1961). EDTA blood samples were processed
11 for Packed Cell Volume (PCV) determination (Jain, 1993). After centrifugation, the
12 plasmas were separated and stored at -20°C until being analyzed by the Indirect Fluorescent
13 Antibody Test (IFAT) for detection of anti-*Babesia* antibodies using four fold dilutions,
14 starting at 1:40. An aliquot of each packed red blood cells was frozen for later DNA
15 extractions. During the sampling procedures, all animals were clinically examined and the
16 presence of ticks was recorded. In addition, the animal breed, sex and the age, as informed
17 by the owner or estimated by teeth examination, were recorded.

18

19 **Molecular characterization**

20 DNA was extracted from 300 µl of thawed packed red blood cells from
21 serologically positive animals, using a commercial kit (Wizard Genomic DNA Purification,
22 Promega, Madison, USA).

23 Amplifications of the 18S rDNA were performed using nPCR where the first
24 reaction was carried out according to Zahler *et al* (2000). The nPCR amplifications were

1 done with the set of primers RIB-19 and 793-772R, 455-479F and RIB-20, and 455-479F
2 and 793-772R, which amplify the genus *Babesia* (Zahler *et al*, 2000; Birkenheuer *et al*,
3 2003), in a total volume of 25 µl containing 1 x concentration of PCR buffer (Qiagen,
4 Hilden, Germany), 0.625 U of HotStar Taq Polymerase (Qiagen), 200 µM of each dNTP
5 (Fermentas, St.Leon-Rot, Germany), 1.0 µM of each primer, and 0.5 µl of PCR product.
6 The nPCR amplification was performed in a thermal cycler (iCycler, Biorad, Munich,
7 Germany) with an initial taq polymerase activation step of 13 min at 95°C, followed by 30
8 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min and elongation at
9 72°C for 1 min and 30 sec.

10 PCR products were purified from the 2% agarose gels, using the QIAquick gel
11 extraction kit (Qiagen), and sequenced with the primers RIB-19, RIB-20, 455-479F, 793-
12 772R and BCV-F (Zahler *et al*, 2000; Birkenheuer *et al*, 2003).

13 Sequence alignments were performed using CLUSTAL W of the DNAMAN
14 software package (Lynnon Bio Soft, Quebec, Canada) and the search for identity was
15 performed with Blast n. For comparison, *B. vogeli* sequences from Brazil (Genbank
16 accession number AY371194), Spain (AY150061), France (AY072925), Japan
17 (AY077719), Australia (AY102162), and South Africa (AF548006) were included in the
18 analyses.

19

20 **Statistical analysis**

21 The results were analyzed by 2 x K contingency tables of exposure variables. The
22 outcome variable was seropositivity to *B. vogeli* and the independent variables were: age
23 (<2 years, 2 to 5 years or >5 years old), sex (male, female), tick (presence or absence),

1 species of tick (*R. sanguineus*, *A. cajennense*, and *Boophilus microplus*), breed (mongrel
2 dogs or pure breeds), and PCV (below or above 30%). The Chi-square test was used to
3 evaluate any associations between perceptual IFAT titer, prevalence and incidence among
4 municipality and infestation rates of ticks; a probability of less than 0.05 was considered to
5 be statistically significant. Odds Ratios (OR) and *P*-values were calculated separately for
6 each variable using the BioEstat software (Ayres *et al*, 2003) and logistic regression was
7 performed with *P*-value <0.20 of variables in an univariate analysis using the program
8 Minitab 14 for Windows.

9

10 **RESULTS**

11 **Tick species**

12 Three species of ticks were identified in all three regions: *R. sanguineus*, *A.*
13 *cajennense* and *B. microplus*. In Lavras, in addition to those tick species, *A. tigrinum* and *A.*
14 *ovale* were also identified.

15 The most prevalent tick species infesting the dogs was *A. cajennense*, with an
16 overall infestation rate of 35.3% of the dogs. In Lavras, the infestation rate of dogs with *A.*
17 *cajennense* was 15.2% and 21.5%, during the dry and the raining seasons, respectively.
18 These infestation rates were significantly lower (*P*= 0.00) than those observed in Nanuque,
19 which were 65.7% and 47.8%, during the dry and the raining seasons, respectively, and in
20 Belo Horizonte, with 38.0% during the dry season. During the raining season, dogs living
21 in Belo Horizonte (6.7%) and in Lavras were similarly infested by *A. cajennense*.

22 During the two seasons, the overall infestation rate of dogs with *R. sanguineus* was
23 19.0%. In Lavras, the infestation rate of dogs with *R. sanguineus* was 3.3% and 3.1%,
24 during the dry and the raining seasons, respectively. These infestation rates of dogs with *R.*

1 *sanguineus* were significant lower ($P= 0.00$) than those observed in Nanuque, which were
2 36.3% and 26.9%, and in Belo Horizonte, with 12.0% and 36.7%, during the dry and
3 raining seasons respectively.

4 The lowest prevalent tick species was *B. microplus*, with an overall infestation rate
5 of 4.0% of dogs. The origin of the dog did not influence the infestation rates with *B.*
6 *microplus*. In Lavras, the infestation rates of dogs with *B. microplus* were 3.3% and 3.1%,
7 in Nanuque 4.9% and 6.0%, and in Belo Horizonte, 2.0% and 3.3%, during the dry and
8 raining seasons respectively.

9

10 **Prevalence of *B. vogeli***

11 During the dry season, the overall frequency of anti-*B. vogeli* antibodies in the
12 canine population in rural areas of Minas Gerais was 28.7% (70 out of 244 animals). The
13 variables sex, breed and PCV below 30% did not constitute risk factors related to
14 seroprevalence of *B. vogeli*. However, the age of the animals and tick infestation showed a
15 direct relationship with prevalence of *Babesia* infection; the older the animal was the higher
16 the seroprevalence ($P= 0.00$). Dogs older than 5 years of age were 4.3 times more likely to
17 be seropositive to *B. vogeli* than animals below 2 years of age. Animals infested with any
18 tick species and animals infested with *A. cajennense* were 3.1 times more likely to be
19 seropositive to *B. vogeli* than uninfested animals ($P= 0.00$) (Table 1). A comparison among
20 the prevalence observed in each of the three regions shows that Nanuque (49.0%) and Belo
21 Horizonte (34.0%) have significant higher prevalence rates ($P= 0.00$) than Lavras (3.3%).
22 In addition, the most frequent antibody titers observed in Lavras and Belo Horizonte were
23 1:160 and 1:640, while in Nanuque titers higher than 1:640 were predominant (Figure 1).

24

1 **Incidence of *B. vogeli***

2 By re-sampling the same dogs, it was possible to calculate the incidence of *Babesia*
3 infections in the three regions over a 6-month period. This study showed that no new cases
4 occurred in Lavras. On the other hand, the highest incidence was observed in Nanuque,
5 where 8 dogs seroconverted, among the 32 negative animals, giving an incidence of 25.0%.
6 In Belo Horizonte, 6 dogs seroconverted, among 19 negative animals, giving an incidence
7 of 31.6% ($P= 0.00$).

8

9 **Molecular characterization**

10 The DNA sequences obtained from the PCR products of *Babesia*-infected dogs
11 from Lavras, Nanuque and Belo Horizonte showed 100% identity to each other and to that
12 first described by Passos *et al* (2005), confirming the occurrence of *B. vogeli* in rural areas
13 of Minas Gerais. Only one partial sequence of approximately 240 bp from Nanuque
14 (DQ469737) and another sequence of approximately 280 bp from Belo Horizonte
15 (DQ469736) had a 99.0% identity to the sequences described by Passos *et al* (2005).
16 However, the sequence from Nanuque was 100% identical with a sequence from a *B. vogeli*
17 isolate from dogs in South Africa (AF48006).

18

19 **DISCUSSION**

20 Previous studies on canine babesiosis in Brazil have focused only on dogs living in
21 urban areas, particularly in big cities where prevalence rates vary from 37.0 to 67.0%
22 (Dell'Porto, 1986; Ribeiro *et al*, 1990). The present study had the aim to analyze dogs
23 living in rural areas and found that the overall prevalence of *Babesia* infections (28.7%) is
24 lower than those observed for urban areas of Minas Gerais. When analyzing the three

1 different physiographic regions it is possible to note that the infection shows a distinct
2 pattern. However, the molecular characterization by PCR suggests that *B. vogeli* is the only
3 species present in all three regions and therefore the differences in prevalence rates are
4 possibly related to climatic differences among the regions. It is known that the dynamic of
5 tick populations is dependent on climatic conditions and affects transmission, as well as the
6 biological cycle of the *Babesia* parasites and consequently its maintenance in nature
7 (Friedhoff, 1988). The low temperatures observed in Lavras during the dry season resulted
8 in low levels of tick infestations on dogs and, consequently, low prevalence rates of
9 *Babesia* infections in the dog population. Maroli *et al* (1996) consider that temperatures
10 below 18°C and humidity below 50% hinders the development of the biological cycle of *R.*
11 *sanguineus* ticks. The lowest infestation rates of *R. sanguineus* on dogs and the lowest
12 seropositivity rates were found in regions with the lowest temperatures (Lavras), while the
13 highest prevalence rates were observed in regions with higher temperatures (Belo
14 Horizonte and Nanuque), in agreement with the results reported by Levy *et al* (1987). In
15 addition, the antibody titers were considerable higher in these regions, suggesting higher
16 inoculation rates of the *Babesia* parasites by the ticks.

17 In rural areas, the gender of the animals, the PCV, and breed did not constitute risk
18 factors for *B. vogeli* infections. This is in agreement with other studies carried out in urban
19 areas (Bobade *et al*, 1989, Ribeiro *et al*, 1990; Yamane *et al*, 1994). On the other hand, the
20 older the animal is, the higher the chance of seroconverting. These results were expected,
21 since older dogs tend to have higher and more frequent tick infestations and, therefore, have
22 increased possibility of acquiring infection and consequently become chronically infected,
23 as reported by other authors (Breitschwerdt *et al*, 1983; Bobade *et al*, 1989; Ribeiro *et al*,
24 1990).

1 The low prevalence rate and the lack of new cases of infection in Lavras suggest a
2 low level of transmission, either due to the low number of tick vectors or due to alterations
3 on tick behavior, or to both. When submitted to disfavored conditions, such as low
4 temperatures, low humidity, absence of hosts, arthropods reduce their metabolism. This
5 phenomenon is known as diapause (Obenchan & Galun, 1982) and may interfere with tick
6 behavior, for instance by increasing the incubation period of eggs or by inhibiting the
7 search for hosts (Sonenshine, 1991). It may take a long time for ticks to return to their
8 normal behavior after a period of diapause (Sutherst & Bourne, 2006). The higher
9 incidence rates of *B. vogeli* observed in Nanuque and in Belo Horizonte regions corroborate
10 with this hypothesis, since the temperatures in these regions were higher indicating an
11 absence of diapause.

12 The results from the present study indicate that the canine babesiosis by *B. vogeli* is
13 endemic in rural areas in the State of Minas Gerais and its epidemiology is influenced by
14 climatic conditions, mainly by the temperature. These results point to the need of further
15 studies, particularly aiming to identify and to understand the biology of potential vectors
16 and reservoirs.

17

18 **Acknowledgements**

19 The authors thank CNPq (The Brazilian National Council for Scientific and Technological
20 Development) for awarding a PhD scholarship to Livio M. Costa-Júnior, and CAPES and
21 DAAD for the financial support given to the project (Project 182/04).

22

23

24

1 **REFERENCES**

- 2 Aragão, H., Fonseca, F., 1961. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os
3 representantes da fauna ixodológica brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 59,
4 115-129.
- 5 Ayres, M., Ayres-Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2003. BioEstat aplicações
6 estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Brazil/United States. CNPq/Wild life
7 conservation society, 291 pp.
- 8 Bastos, C.V., Moreira, S.M., Passos, L.M.F., 2004. Retrospective study (1998-2001) on
9 canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. Annals of the New
10 York Academic Science 1026, 158–160.
- 11 Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of
12 a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype)
13 and *B. canis* DNA in canine blood samples. Journal of Clinical Microbiology 41, 4172-
14 4177.
- 15 Bobade, P.A., Oduye, O.O., Aghomo, H.O., 1989. Prevalence of antibodies against *Babesia*
16 *canis* in dogs in an endemic area. Revue d'Élevage et de Medecine Veterinaire des Pays
17 Tropicaux 42, 211-217.
- 18 Breitschwerdt, E.B., Malone, J.B., MacWilliams, P., Levy, M.G., Qualls Jr, C.W., Prudich,
19 M.J., 1983. Babesiosis in the Greyhound. Journal of the American Veterinary Medical
20 Association 182, 978-982.
- 21 Centro Panamericano de Zoonosis, 1973. Procedimentos para estudios de prevalência de
22 enfermedades cronicas en el ganado. Ramos Mejia, Buenos Aires. Nota técnica, 18. 35p.

1 Dell'Porto, A. Estudo da ocorrência de *Babesia canis* em cães de rua da cidade de São
2 Paulo. 1986. 94p. Thesis (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva)-Instituto de
3 Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

4 Friedhoff, K.T., 1988. Transmission of *Babesia*. In: Ristic, M. Babesiosis of domestic
5 animals and man. Boca Raton: CRC Press, 23-52.

6 Jain, N.C., 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 417 p.

7 Kuttler, K.L., 1988. World wide impact of babesiosis. In: Ristic, M. Babesiosis of domestic
8 animals and man. Boca Raton: CRC Press, 1-22.

9 Labruna, M.B., Pereira, M.C., 2001. Carrapatos em cães do Brasil. Clínica Veterinária 30,
10 24-32.

11 Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., Moncol, D.J., 1987. Antibody activity to *Babesia canis* in
12 dogs in North Carolina. Journal of the American Veterinary Medical Association 48,
13 339-341.

14 Maroli, M., Houry, C., Frusteri, L., Manilla, G., 1996. Diffusione della zecca del cane
15 (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806) in Italia: un problema di salute pubblica.
16 Annali Dell' Istituto Superiore di Sanità 32, 387-397.

17 Nutall, G.H.F., Warburton, C., Robinson, L.E., 1926. Ticks: a monograph of the ixodoidea,
18 Part IV The genus *Amblyomma*. Cambridge University Press, 302 p.

19 Obenchan, F.D., Galun, R. (eds.), 1982. Physiology of Ticks. Great British Library, 470 p.

20 Passos, L.M., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F., Pfister, K., Zahler-Rinder, M., 2005. First
21 molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. Veterinary Parasitology 127,
22 81-5.

1 Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., Lima, J.D., Guimarães, A.M., 1990. (Frequency of anti-
2 *Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais). Arquivo Brasileiro
3 de Medicina Veterinária e Zootecnia 42, 511-517.

4 Shaw, S.E., Dayb, M.J., Birtlesc, R.J., Breitschwerdt, E.B., 2001. Tick-borne infectious
5 diseases of dogs. Trends Parasitol 17, 74-80.

6 Sonenshine, D.E., 1993. Biology of Ticks. New York: Oxford University Press. EUA,
7 463p.

8 Sutherst, R.W., Bourne, A.S., 2006. The effect of desiccation and low temperature on the
9 viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
10 (Murrell and Barker) (Ixodidae). International Journal for Parasitology 36, 193-200.

11 Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., de Moraes, H.S., 2006. *Babesia*
12 *gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. Veterinary Parasitology 141, 177-180.

13 Yamane, I., Gardner, I.A., Ryan, C.P., Levy, M., Urrico, J., Conrad, P.A., 1994. Serosurvey
14 of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA.
15 Preventive Veterinary Medicine 18, 293- 304.

16 Zahler, M., Rinder, H., Zweygarth, E., Fukata, T., Maede, Y., Schein, E., Gothe, R., 2000.
17 *Babesia gibsoni* of dogs from North America and Asia belong to different species.
18 Parasitology 120, 365-369.

19

- 1 Table 1 - Prevalence rates, and factors associated with *Babesia vogeli* infections in dogs
 2 living in rural areas of Minas Gerais, Brazil, 2004.

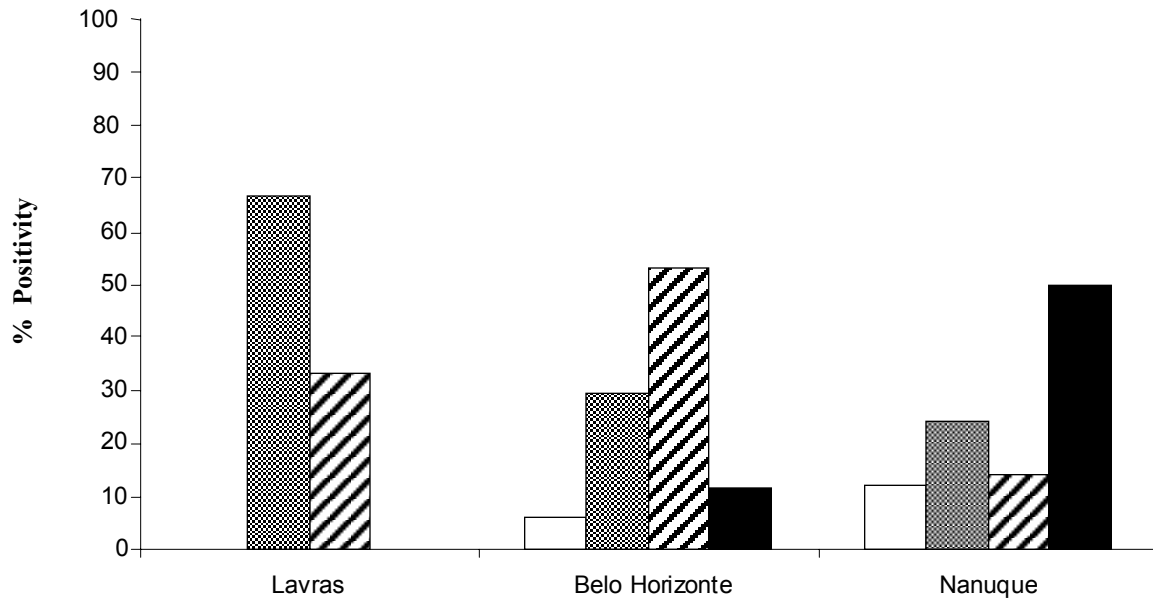
Variable	Serology			
	% Prevalence (+ / n)	OR	P-value	95% CI
Age				
<2 years	9.0 (22/122)	Ref.	Ref.	Ref.
2 – 5 years	35.0 (21/60)	2.66	0.00	1.29-5.52
>5 years old	43.5 (27/62)	4.30	0.00	2.09-8.85
Sex				
Female	21.9 (14/64)	Ref.	Ref.	Ref.
Male	33.1 (56/180)	0.57	0.12	0.27-1.17
Tick^a				
Absent	19.4 (25/129)	Ref.	Ref.	Ref.
Present	39.1 (45/115)	3.12	0.00	1.69-5.75
Species of Tick^a				
Absent	19.4 (25/129)	Ref.	Ref.	Ref.
<i>R. sanguineus</i>	43.5 (20/46)	1.99	0.06	0.95-4.15
<i>A. cajennense</i>	40.0 (40/100)	3.06	0.00	1.67-5.61
<i>B. microplus</i>	22.2 (2/9)	0.63	0.58	0.12-3.29
Breed				
Pure breeds	18.87 (10/53)	Ref.	Ref.	Ref.
Mongrel	31.41 (60/191)	1.51	0.32	0.67-3.41
PCV (%)				
> 30	30.85 (62/201)	Ref.	Ref.	Ref.
< 30	18.60 (8/43)	1.78	0.21	0.72-4.39
Overall prevalence	28.69 (70/244)			

3

- 4 +: Number of positive animals; n: number of samples per variable; OR: Odds Ratios; P-value: probability; 95%
 5 CI: 95% Confidence Interval; Ref.: variable used as a reference value; a: Observation during blood collection;
 6 Hosmer-Lemeshow $P = 0.98$.

7

1



2

3 Figure 1: Frequency of antibody titers, 1:40 (□), 1:160 (▒), 1:640 (▤), and >1:640 (■)
4 against *Babesia vogeli* in dogs living in farms in Lavras, Belo Horizonte and Nanuque,
5 during the dry season in the State of Minas Gerais, Brazil, 2004.

6

Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis* in endemic regions

Costa-Júnior, L.M. et al.

Introduction

Babesia species are tick-transmitted apicomplexa parasites that infect a wide range of vertebrate hosts and cause severe diseases in wild and domestic animals (Kuttler, 1988). *B. canis* and *B. gibsoni* are recognized as the two species that cause canine babesiosis, a clinically significant hemolytic disease of dogs (Yamane et al., 1993; Lobetti, 1998).

Three subspecies of *B. canis* have been proposed (Uilenberg et al., 1989): *B. canis rossi*, transmitted by the tick *Haemaphysalis leachi* in South Africa and causing a usually fatal infection in domestic dogs even after treatment; *B. canis canis*, transmitted by *Dermacentor reticulatus* in Europe and showing a more variable pathogenicity; and *B. canis vogeli*, transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* in tropical and subtropical countries, and leading to a moderate, often clinically unapparent infection (Uilenberg et al., 1989; Hauschild et al., 1995; Zahler et al., 1998; Cacciò et al., 2002).

A recent molecular study carried out with Brazilian samples from infected dogs living in urban areas has shown that *B. canis vogeli* is the etiological agent involved in all cases (Passos et al, 2005) and only very recently few cases of *Babesia gibsoni* infections have been molecularly characterized in dogs of the South regions in Brazil (Trapp et al., 2006a). Although the importance of canine babesiosis has increased over the last years in urban areas of the State of Minas Gerais (Bastos et al., 2004), only recently the prevalence rates in rural areas of Minas Gerais have been determined. In

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

addition, *B. canis vogeli* was the only subspecies identified in these rural areas (Costa-Junior et al, In Press).

Usually, the *Babesia* diagnosis is made upon size and morphological appearance of the intra-erythrocytic forms in peripheral blood smears. However, the parasitaemia are usually very low or not detectable in blood smears in animals of chronic phase. The Polymerase Chain Reaction (PCR) and the nested PCR offers a practical means to detect and differentiate infections with various *Babesia* spp. and also provides a sensitive tool for assessing treatment outcomes (Birkenheuer et al., 2003). Real-Time PCR detection is replacing the conventional PCR, nested PCR and sequencing methods in the diagnosis and follow-up of many diseases, providing the ability to perform very sensitive, accurate and reproducible measurements of specific DNA present in a sample (Bretagne et al., 2001; Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Matsuu et al., 2005; Oyamada et al., 2005).

In the present study a Real Time PCR test was developed for canine babesiosis with the aim to differentiate the three subspecies of *B. canis*. The test was validated in an epidemiological study of prevalence, incidence and evaluation of factors associated with *Babesia* infections in rural areas in the state of Minas Gerais, Brazil during a dry and a raining season.

Materials and Methods

Development of Real Time PCR

Primers and probes designs

The sequences of internal transcribed spacer (ITS) of *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. gibsoni*, *B. microti*, *Hepatozoon canis*, *H. americanum*, *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma variegatum*, *Ixodes*

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

scapularis, *Mus musculus*, *Homo sapiens* and *Oryctolactus cuniculus* available in Genbank were alignments using CLUSTAL W and primers and probes specific for *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossii* (Tables 1 and 2) were designed using the DNAMAN software package (Lynnon Bio Soft, Quebec, Canada).

PCRs analysis

For detection of *B. canis vogeli*, *B. canis canis* and *B. canis rossii*, a real-time PCR was performed with the primers (Table 1) for amplifying a fragment (around 125 bp) at the 3' end of the ITS 2 of the rDNA. Detection of specific products was based on hybridization with a fluorescent probe of the molecular beacon type (Table 2). Amplifications were done in a total volume of 25 µl containing Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8.0 mM of MgCl₂, and 1.25 U HotStar Taq polymerase (Qiagen, Hilden), as well as 200 µM of each dNTP, 25 pmol of each primer, 5 pmol of each probe and 250 ng of DNA. For each PCR test, an appropriate number of positive controls with genomic babesial DNA and negative controls containing DNA from uninfected dogs were included in every run. Amplifications of target genes were done using an iCycler (Biorad, Munich) with an initial Taq Polymerase activation step of 13 min at 95°C followed by 50 cycles at 95°C for 30 sec, annealing at 50°C for 30 sec and elongation at 72°C for 30 sec. Fluorescence was measured at each annealing step. Reactions were evaluated using the software version 3.1 (iCycler iQ real-time PCR detection system, Biorad) and were regarded as positive if the amount of fluorescence exceeded a threshold value (basal emission plus the 10 fold of its standard deviation) and followed a curve of a sigmoid shape.

For detection of *B. gibsoni*, a Semi-Nested PCR was performed with the primers described in Table 1, according to Birkenheuer et al. (2003).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Epidemiological Study

Location and climatic conditions

The study was carried out in rural areas of three regions within the State of Minas Gerais, Brazil: Lavras (latitude–S 21°20'; longitude–W 45°00'), Belo Horizonte (latitude–S 19°55'; longitude–W 43°56') and Nanuque (latitude–S 17°49'; longitude–W 40°20'). In these areas two seasons are well defined during the year: a dry season (from April to September) and a raining season (from October to March). Belo Horizonte and Lavras have both a high-altitude tropical climate (elevation 850 to 900 m above sea level), corresponding to class Cwa (Köppen classification), whereas Nanuque has a tropical humid weather (altitude around 300 m above sea level), class Aw (Köppen classification). The climatic data, as referred in <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb?uf=MG>, were obtained throughout the experimental period and the means were calculated.

Sampling procedure

During dry season of 2004, ticks and blood samples were collected from 252 dogs living in farms as follows: Lavras (n=100), Belo Horizonte (n=50) and Nanuque (n=102). Samples were collected randomly in farms in each region and the number of dogs to be sampled was calculated based in a preliminary study of seroprevalency to *B. canis vogeli* (Costa-Júnior et al., In Press) according to Centro Panamericano de Zoonosis (1973). In the subsequent raining season, the same dogs were supposed to be re-sampled. However, some of the dogs had either died, or been transferred to another farm or were missing and, therefore, the following numbers of dogs were re-sampled in each region: Lavras (n=71), Belo Horizonte (n=29) and Nanuque (n=66).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Thin blood smears were prepared using peripheral blood and stained with a Giemsa and examined by light microscope at 1000 X. The EDTA blood samples were collected for Packed Cell Volume (PCV) determination (Jain, 1993) and DNA extraction from whole blood with the Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA). The DNA was amounted using the spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA) and was diluted for 50 ng/ μ l.

Ticks were collected in dogs were placed into tubes containing 70% alcohol and were identified according to Nuttall *et al* (1926) and Aragão & Fonseca (1961).

During the sampling procedures, all animals were clinically examined and the presence of ticks was recorded. In addition, the animal breed, sex and age, as informed by the owner or estimated by teeth examination, were recorded.

Statistical analysis

The results were analyzed by 2 x K contingency tables of exposure variables. The outcome variable was positivity to *Babesia* spp. and the independent variables were: age (<2 years, 2 to 5 years or >5 years old), sex (male, female), tick (presence or absence), species of tick (*R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, and *B. microplus*), breed (mongrel dogs or pure breeds), and PCV (below or above 30%). The Chi-square test was used to evaluate any associations between prevalence and incidence among municipality. Odds Ratios (OR) and *P*-values were calculated separately for each variable using the BioEstat software (Ayres *et al*, 2003) and logistic regression was performed with *P*-value <0.20 of variables in an univariate analysis using the program Minitab 14 for Windows. The significance level was defined as *p* <0.05.

Results

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Babesia species and subspecies

Only large merozoites and trophozoites (size > 2.5 µm) typical of *B. canis* were found in blood smears. Results of PCR showed no amplification of *B. canis canis*, *B. canis rossi* or *B. gibsoni* and all positive reactions showed specific amplification of *B. canis vogeli* for dogs in all three rural areas of Minas Gerais.

Prevalence by blood smears examination

The overall prevalence of *B. canis* by blood smears was 0.8% (only 2 out of 252 animals). In Lavras region all animals were negative; however in Nanuque and Belo Horizonte the prevalence rates were 1.0 (1/102) and 2.0% (1/50), respectively.

Prevalence by Real Time PCR

Using Real Time PCR technique the overall prevalence of *B. canis vogeli* at canine population in rural areas of Minas Gerais was 9.9% (25 out of 252 animals). The variables sex, age, breed, PCV, and infestation by *A. cajennense* and *B. microplus* did not constitute risk factors ($p > 0.05$) related to prevalence of *B. canis vogeli*. Animals infested by *R. sanguineus* were 2.9 times ($p = 0.02$; 95% IC 1.18 - 7.10) more likely to be positive to *B. canis vogeli*.

A comparison among the prevalence observed in each of the three regions shows that Nanuque (13.7%) and Belo Horizonte (12.0%) have significant higher prevalence rates ($p < 0.05$) than Lavras (5.0%).

Incidence by PCR

Re-sampling the same dogs in the raining season, it was possible to calculate the incidence of *B. canis vogeli* infections in the three regions. By PCR this study showed that in Lavras only one new case occurred, resulting an incidence of 1.5%. In Belo

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Horizonte one new case occurred among 24 animals negative, giving an incidence of 4.2%. However, the highest incidence was observed in Nanuque, where 14 new cases were identified among 58 animals, giving an incidence of 24.1%.

Discussion

Three subspecies of *B. canis* have been proposed (Uilenberg et al., 1989) and detected in many countries on the world (Martinod et al., 1986; Uilenberg et al., 1989; Matjila et al., 2004). However the differential diagnostic of this subspecies are impossible by usual diagnostic, as blood smears. In the present study we development the Real Time PCR for specific diagnostic of *B. canis canis*, *B. canis rossi* and *B. canis vogeli* and use this technique together with a semi nested PCR for specific diagnostic of *B. gibsoni* for looking for these species and subspecies in rural areas from Brazil.

Only the subspecie *B. canis vogeli* was recently detected in Brazil in urban and rural area, but always with few samples analyzed (Passos et al., 2005; Costa-Júnior et al., In Press). In this study we confirm the presence only the *B. canis vogeli* in rural area of Minas Gerais state (Lavras, Belo Horizonte and Nanuque regions) and found the ticks *A. cajennense*, *R. sanguineus* and *B. microplus* none this have been recognize vector of *B. canis canis* and *B. canis rossi* (Uilenberg et al., 1989; Hauschild et al., 1995; Zahler et al., 1998; Cacciò et al., 2002).

A small piroplasm morphologically similar to *B. gibsoni* was observed in peripheral blood smears in dogs from Rio Grande do Sul state (Braccini et al., 1992) and São Paulo state (Lucidi et al., 2004), antibodies specific to this parasite was detected in animals when came back to Germany after traveling by Brazil (Gothe & Wegerdt, 1991) and recently confirm by molecular methods in animals from veterinary hospital from southern of Brazil (Trapp et al., 2006a). In Minas Gerais state was not

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

related dogs positive for *B. gibsoni* and we not found animals parasited with this parasite in rural area.

We found in rural areas from Minas Gerais, a overall prevalence of *B. canis* by blood smears of 0.8% (2 out of 252 animals), has been in Belo Horizonte region the highest prevalence (2.0%). Few studies were performed in rural areas from Brazil where the prevalence are between 1.9 to 5.2% (O'Dwyer, 2000; Rodrigues et al., 2004).

The standard method for quantification of parasites is microscopic examination of a blood smear. Although this method is a rapid and inexpensive diagnostic test, it is, however, of low sensitivity in detecting the parasites when an animal has low parasitemia (Levy et al., 1987; Böse et al., 1995; Wlosniewski et al., 1997). The low prevalence found in these studies shown the low sensibility from blood smears and the difficulty to use this technique for epidemiological studies.

Real time PCR is a method that can be used to monitor amplicon formation throughout the PCR reaction providing the ability to perform very sensitive, accurate and reproducible measurements of specific DNA present in a sample (Bretagne et al., 2001; Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Matsuu et al., 2005; Oyamada et al., 2005). In the present study, we development and used a highly sensitive qualitative real time PCR that amplified a 125 bp fragment at the 3'end of ITS2 of the rDNA of *B. canis* subspecies. We found prevalence of *B. canis vogeli* by Real Time PCR (9.9%) highest than found by blood smears (0.8%) which confirm the higher sensibility the technique development than microscopic examination.

The highest prevalence was found in Nanuque (13.7%) and Belo Horizonte (12.0%) regions where shown highest temperature. The lowest prevalence was found in Lavras where shown lowest temperature than others regions studied (data not shown). These data, jointly the higher incidence rates of *B. canis vogeli* observed in Nanuque

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

(24.1%), confirm the hypothesis the presence of diapause of tick in Lavras region and indicate that the canine babesiosis by *B. canis vogeli* is endemic in rural areas in the State of Minas Gerais and its epidemiology is influenced by climatic conditions, mainly by the temperature (Maia et al., 2007; Costa-Júnior et al., In Press).

Little is known about the possible risk factors for canine babesiosis in Brazil, and the few studies are performed using IFAT as diagnostic methods (Trapp et al., 2006b; Maia et al., 2007; Costa-Júnior et al., In Press) despite are not applicable for routine diagnosis (Böse et al., 1995). In rural areas from Brazil, the gender of the animals, the PCV, breed and infestation by *A. cajennense* and *B. microplus* did not constitute risk factors for *B. canis vogeli* infections. On the other hand, animals infected by *R. sanguineus* shown higher the chance to be positive to *B. canis vogeli* by Real Time PCR. Others studies carried out in urban areas from Brazil and using IFAT as diagnostic methods related infestation by any ticks as associated factor for *B. canis vogeli* infections (Trapp et al., 2006b; Costa-Júnior et al., In Press).

Acknowledgements

The authors thank CNPq (The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) for awarding a PhD scholarship to Livio M. Costa-Júnior, and CAPES and DAAD for the financial support given to the project (Project 182/04).

References

Aragão, H., Fonseca, F., 1961. Notas de ixodologia VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 59, 115-129.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

- Ayres, M., Ayres-Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2003. BioEstat aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Brazil/United States. CNPq/Wild life conservation society, 291 pp.
- Bastos, C.V., Moreira, S.M., Passos, L.M.F., 2004. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. Ann. New York Acad. Sci. 1026, 158–160.
- Bell, A.S., Ranford-Cartwright, L.C., 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends Parasitol. 18, 337–342.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J. Clin. Microbiol. 41, 4172-4177.
- Bose, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., de Vos, A.J., 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet. Parasitol. 57, 61-74.
- Braccini, G.L., Chaplin, E.L., Stobbe, N.S., Araujo, F.A.P., Santos, N.R., 1992. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande Do Sul, Brazil, 1986-1990. *Arquivos da Faculdade de Veterinaria, UFRGS*. 20, 134-149.
- Bretagne, S., Durand, R., Olivi, M., Garin, J.F., Sulahian, A., Rivollet, D., Vidaud, M., Deniau, M. 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 828-31.
- Centro Panamericano de Zoonosis., 1973. Procedimentos para estudios de prevalência de enfermidades crônicas en el ganado. Ramos Mejia, Buenos Aires. Nota técnica, 18. 35p.

- Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 2002. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 106, 285-92.
- Costa-Júnior, L.M., Ribeiro, M.F.B., Rembeck, K., Rabelo, E.M.L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., Pfister, K., Passos, L.M.F. Factors associated with seroprevalence of canine babesiosis caused by *Babesia vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil. *Res. Vet. Sci.* In Press.
- Gothe, R., Wegerdt, S., 1991. Babesiosis of dogs in Germany: epidemiologic case analysis. *Tierarztl. Prax.* 19, 170-173.
- Hauschild, S.; Shayan, P.; Schein, E., 1995. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. *Parasitol. Res.* 81, 638-42.
- Jain, N.C., 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 417 p.
- Kuttler, K.L., 1998. World-wide impact of babesiosis. In: Ristic M (Ed.), *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-22.
- Lobetti, R.G., 1998. Canine babesiosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 20, 418-430.
- Lucidi, C.A., Angerami, J.T.S., Rodrigues, R.R., Takahira, R.K., 2004. Primeira ocorrência de *Babesia gibsoni* no Estado de São Paulo: Nota preliminar. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13, suplement. 1, 231.
- Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., Moncol, D.J., 1987. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. *Am. J. Vet. Res.* 48, 339-341.

- Maia, M.G., Costa, R.T., Haddad, J.P.A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., 2007. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid of the state Minas Gerais, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 79, 155-162.
- Martinod, S., Laurent, N., Moreau, Y., 1986. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 19, 245-54.
- Matjila, P.T., Penzhorn, B.L., Bekker, C.P., Nijhof, A.M., Jongejan, F., 2004. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 122, 119-125.
- Matsuu, A., Ono, S., Ikadai, H., Uchide, T., Imamura, S., Onuma, M., Okano, S., Higuchi, S., 2005. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 569–573.
- Nuttall, G.H.F., Warburton, C., Robinson, L.E., 1926. Ticks: a monograph of the ixodoidea, Part IV The genus *Amblyomma*. Cambridge University Press, 302 p.
- O'Dwyer, L.H.O., 2000. Diagnóstico de hemoparasitas e carrapatos de cães provenientes de áreas rurais em três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. 97f. PhD Thesis. Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Itamoto, K., Okuda, M., Inokuma, H., 2005. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1343-1346.
- Passos, L.M., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F., Pfister, K., Zahler-Rinder, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 127, 81-85.

Rodrigues, D., Daemon, E., Rodrigues, A.F.S.F., Feliciano, E.A., Soares, A.O., Souza, A.D. 2004. Levantamento de hemoparasitos em cães da área rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, suplement. 1, 371.

Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., Morais, H.S., 2006a. Babesia gibsoni genotype Asia in dogs from Brazil. Vet. Parasitol. 141, 177-80.

Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., Morais, H.S., 2006b. Soroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. Vet. Parasitol. 140, 223-230.

Uilenberg, G., Franssen, F.F.J., Perié, N.M., Spanjer, A.A.M., 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. Vet. Q. 11, 33-40.

Wlosniewski, A., Leriche, M.A., Chavigny, C., Ulmer, P., Donnay, V., Boulouis, H.J., Mahl, P., Druilhe, P., 1997. Asymptomatic carriers of *Babesia canis* in an enzootic area. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 20, 75-86.

Yamane, I., Conrad, P.A., Gardner, I., 1993. *Babesia gibsoni* infections in dogs. J. Protozool. Res. 3, 111-125.

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R., 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. Parasitol. Res. 84, 544-548.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Table 01: Sequences for the oligonucleotide primers development in this study

Primers	Sequence 5' – 3'	Specie or Subspecie
BC-1	TGT GTA CTT GTT ACC GAA TCT TC	<i>B. canis canis</i>
BC-2	TGC TTA AAT TCA GCG GAT AG	<i>B. canis vogeli</i>
BC-3	TGT GTA TGT GAT ACC GAA TCT TC	<i>B. canis rossi</i>
BC-4	GCT TAA ATT CGG CGG ATA G	<i>B. canis rossi</i>
BC-6	CTT AAA TTC GGC GGA TCC	<i>Babesia</i> spp.
455-479- F	GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG TGA C	<i>Babesia</i> spp.
793-772- R	ATG CCC CCA ACC GTT CCT ATT A	<i>Babesia</i> spp.
BgibAsia- F	ACT CGG CTA CTT GCC TTG TC	<i>B. gibsoni</i>

Table 02: Probes development in this study

Probes	Sequence 5' – 3'	Subspecie
BC-S1	6-FAM CGCGATGGCGTTGCCCGAGACTGTGATCGCG Dabcyl	<i>B. canis canis</i>
BV-S2	HEX CGCGATGTGAGCCGTCTGACTCCGTGTATCGCG Dabcyl	<i>B. canis vogeli</i>
BR-S3	BHQ-3 CGCGAGACGCTGTATGGTTGTGGATGATCGCG Cy5	<i>B. canis rossi</i>
BR-S4	BHQ-3 CGCGATGAGCTTGCAACCACAACCATATAAATCGCG Cy5	<i>B. canis rossi</i>

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

4.4. Fatores associados com a prevalência, através PCR em tempo real, de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*.

PCR em tempo real para o diagnóstico de *E. canis* e *A. platys* foi realizada em 248 amostras de animais de áreas rurais colhidos durante a estação seca de 2004, sendo 97 da microrregião de Lavras, 102 da microrregião de Nanuque e 49 da microrregião de Belo Horizonte. Na amostragem da estação chuvosa foram colhidas 165 amostras sendo 69 da microrregião de Lavras, 67 de Nanuque e 29 de Belo Horizonte. Amostras de 98 animais colhidas nesta mesma estação de áreas urbanas também foram processadas sendo 37 animais da microrregião de Lavras, 41 da microrregião de Nanuque e 20 da microrregião de Belo Horizonte.

4.4.1. Prevalência de *Ehrlichia canis*

A prevalência de *E. canis* observada em áreas rurais do Estado de Minas Gerais foi de 1,03 (1/97); 24,49% (12/49) e 26,47 (27/102) nas microrregiões de Lavras, Belo Horizonte e Nanuque, respectivamente.

Animais que vivem em áreas rurais das microrregiões de Nanuque e Belo Horizonte têm 4,79 ($P=0,00$; IC 95% 2,34-9,79) e 2,44 ($P= 0,03$; IC 95% 1,14-5,23) mais chances de estarem infectados com *E. canis* comparados com os da microrregião de Lavras. Dentro de cada região não foi observada nenhuma associação entre as variáveis estudadas e a positividade para *E. canis*.

A prevalência geral de *E. canis* em áreas rurais de Minas Gerais foi de 16,13% (40/248), sendo que animais infestados com *R. sanguineus* e *A. cajennense* têm 3,00 ($P= 0,00$; IC 95% 1,38-6,51) e 2,65 ($P= 0,01$; IC 95% 1,27-5,56) vezes mais chances de serem positivos do que animais que não foram encontrados infestados com carrapatos (Tab. 6).

Tabela 6 – Taxa de prevalência e fatores associados com infecções de *Ehrlichia canis* diagnosticadas através de PCR em tempo real em cães oriundos de áreas rurais de Minas Gerais, Brasil, 2004.

Variável	% Prevalência (+ / n)	PCR em tempo real para <i>E. canis</i>		
		OR	P	IC 95%
Idade				
<2 anos	14,5 (18/124)	Ref.	Ref.	Ref.
2 – 5 anos	14,5 (9/62)	1,16	0,75	0,45-2,96
>5 anos	21,0 (13/62)	1,97	0,09	0,89-4,36
Sexo				
Fêmea	10,3 (7/68)	Ref.	Ref.	Ref.
Macho	18,3 (33/180)	2,06	0,12	0,82-5,18
Carrapatos^a				
Ausente	7,7 (10/129)	Ref.	Ref.	Ref.
Presente	25,1 (30/119)	1,52	0,60	0,32-7,35
Espécies de Carrapatos				
Ausente	7,7 (10/129)	Ref.	Ref.	Ref.
<i>R. sanguineus</i>	34,8 (16/46)	3,00	0,00	1,38-6,51
<i>A. cajennense</i>	26,0 (26/100)	2,65	0,01	1,27-5,56
<i>B. microplus</i>	11,1 (1/9)	0,42	0,44	0,05-3,88
Raça				
Raça pura	7,8 (4/51)	Ref.	Ref.	Ref.
SRD ^b	18,3 (36/197)	2,11	0,20	0,67-6,64
Hematócrito (%)				
> 30	14,6 (29/199)	Ref.	Ref.	Ref.
< 30	22,4 (11/49)	0,46	0,07	0,20-1,08
Prevalência Geral		16,13 (40/208)		

+: Número de animais positivos; n: Número de amostras por variáveis; OR: Odds Ratios; P: Probabilidade; IC 95%: Intervalo de Confiança a 95%; Ref.: Variável usada como valor de referência; a: Carrapatos observados durante a coleta de sangue; b: Sem Raça Definida.

A prevalência geral observada de *E. canis* em áreas urbanas foi menor (9,18%) do que em áreas rurais. A prevalência deste parasito nas microrregiões de Lavras (0,00%), Nanuque (1,84%) e Belo Horizonte (3,65%) não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$). Apenas a infestação por *R. sanguineus* (OR=6,3; $P = 0,03$; IC 95% 1,22-32,27) constituiu fator de risco para a infecção por *E. canis* em áreas urbanas de Minas Gerais.

4.4.2. Incidência de *Ehrlichia canis*

A incidência geral de *E. canis* observada em áreas rurais de Minas Gerais foi de 8,2% (12/158). Na microrregião de Lavras nenhum cão dos 67 negativos na estação seca, tornou-se positivo na estação chuvosa. Em contrapartida, a incidência de *E. canis* nas microrregiões de Nanuque e Belo Horizonte foram de 7,69% (4/52) e 29,6% (8/27) respectivamente, sendo estes valores significativamente diferentes ($P < 0,05$) dos observados na microrregião de Lavras.

4.4.3. Prevalência de *Anaplasma platys*

A prevalência de *A. platys* observada em áreas rurais do Estado de Minas Gerais foi de 4,08% (2/49), 7,22 (7/97) e 19,61 (20/102) nas microrregiões de Belo Horizonte, Lavras, e Nanuque, respectivamente.

Animais que vivem em áreas rurais da microrregião de Nanuque têm 3,71 ($P = 0,00$; IC 95% 1,61-8,53) mais chances de estarem infectados com *A. platys* do que os animais que vivem em áreas rurais das outras regiões estudadas. Apenas na microrregião de Nanuque, o sexo feminino (OR= 3,47; $P = 0,05$; IC 95% 1,13-10,61) e a infestação por *R. sanguineus* (OR= 4,48; $P = 0,00$; IC 95% 1,59-12,63) constituíram fatores de risco para a infecção de *A. platys*. Nas outras regiões nenhuma associação entre as variáveis estudadas foi observada.

A prevalência geral de *A. platys* em áreas rurais estudadas foi de 11,69% (29/248), sendo que animais infestados com qualquer espécie de carrapato (OR= 3,74; $P = 0,00$; IC 95% 1,53-9,11), assim como animais infestados com *R. sanguineus* (OR= 4,38; $P = 0,00$; IC 95% 1,92-10,00) têm mais chances de estarem infectados com *A. platys* do que animais não infestados (Tab. 7).

Tabela 7 – Taxa de prevalência e fatores associados com infecções por *Anaplasma platys* diagnosticadas através de PCR em Tempo Real em cães oriundos de áreas rurais de Minas Gerais, Brasil, 2004.

Variável	% Prevalência (+ / n)	PCR em tempo real para <i>A. platys</i>		
		OR	P	IC 95%
Idade				
<2 anos	13,7 (17/124)	Ref.	Ref.	Ref.
2 – 5 anos	6,4 (4/62)	0,50	0,22	0,16-1,53
>5 anos	12,9 (8/62)	1,11	0,82	0,43-2,85
Sexo				
Fêmea	11,8 (8/68)	Ref.	Ref.	Ref.
Macho	11,7 (21/180)	0,90	0,82	0,36-2,25
Carrapatos^a				
Ausente	5,6 (7/126)	Ref.	Ref.	Ref.
Presente	18,0 (22/122)	3,74	0,00	1,53-9,11
Espécies de Carrapatos				
Ausente	5,6 (7/126)	Ref.	Ref.	Ref.
<i>R. sanguineus</i>	28,3 (13/46)	4,38	0,00	1,92-10,00
<i>A. cajennense</i>	17,0 (17/100)	1,72	0,20	0,74-3,99
<i>B. microplus</i>	22,2 (2/9)	1,93	0,47	0,32-11,60
Raça				
Raça pura	11,8 (6/51)	Ref.	Ref.	Ref.
SRD ^b	11,7 (23/197)	0,92	0,87	0,33-2,59
Hematócrito (%)				
> 30	11,1 (22/199)	Ref.	Ref.	Ref.
< 30	14,3 (7/49)	0,67	0,42	0,26-1,76
Prevalência Geral				
	11,69 (29/208)			

+: Número de animais positivos; n: Número de amostras por variáveis; OR: Odds Ratios; P: Probabilidade; IC 95%: Intervalo de Confiança a 95%; Ref.: Variável usada como valor de referência; a: Carrapatos observados durante a coleta de sangue; b: Sem Raça Definida.

A prevalência geral observada de *A. platys* em áreas urbanas (5,1%) foi menor do que as encontradas em áreas rurais. A prevalência deste parasito nas microrregiões de Lavras (0,00%), Nanuque (9,76%) e Belo Horizonte (5,00%) não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$). Nenhuma variável estudada constituiu fator de risco para a infecção de *A. platys* em áreas urbanas de Minas Gerais.

4.4.4. Incidência de *Anaplasma platys*

A incidência geral de *A. platys* observada em áreas rurais de Minas Gerais foi de 12,33% (18/146). Na microrregião de Lavras nenhum cão dos 62 negativos na estação seca, tornou-se positivo na estação chuvosa. A incidência de *A. platys* nas microrregiões de Nanuque e Belo Horizonte foram de 22,81% (13/57) e 18,52% (5/27), sendo estes valores significativamente diferentes ($P < 0,01$) dos observados na microrregião de Lavras.

4.4.5. Discussão

A prevalência da ehrlichiose e anaplasmoses canina varia de acordo com as condições climáticas (Keefe et al., 1982) e devido alguns fatores epidemiológicos, tais como a distribuição dos vetores, sobrevivência do animal, média de idade da população estudada, práticas de manejo e habitat dos animais (Sainz et al., 1996, Rodriguez-Vivas et al., 2005).

A prevalência de *E. canis* e *A. platys* no Brasil, determinada através de métodos moleculares, varia de 9,53 a 85,72% (Dagnone et al., 2003; Dagnone et al., 2004; Souza et al., 2004), dependendo da população estudada e da técnica utilizada; porém todos esses estudos foram realizados em áreas urbanas. No presente trabalho encontramos prevalências de *E. canis* e *A. platys* em áreas urbanas (9,18 e 5,10%, respectivamente) significativamente menores do que as observadas em áreas rurais (16,13 e 11,69%, respectivamente).

Estes resultados sugerem que os cães que vivem em áreas rurais estejam mais expostos aos carrapatos vetores do que os que vivem em áreas urbanas. Além disso, pode-se inferir que os animais de áreas urbanas sejam tratados com maior frequência com acaricidas, enquanto que os animais de áreas rurais recebem menos

cuidados e raramente são tratados com acaricidas. Este fato pôde ser confirmado durante as entrevistas, quando muitos proprietários de áreas rurais relataram que sacrificaram ou doaram seus cães pelo fato deles estarem 'perturbando' os bovinos.

O principal vetor de *E. canis* é o ixodídeo *R. sanguineus*, cuja distribuição geográfica mundial coincide com a da Ehrliquiose canina (Winler et al., 1990, Labruna et al., 2005, 2007). Embora sem confirmação experimental, o carrapato *R. sanguineus* tem sido também incriminado como o principal transmissor de *A. platys* (Hibler et al., 1986; Woody & Hoskins, 1991; Harrus et al., 1997), já que a infecção tem sido freqüentemente detectada nesta espécie de carrapato (Inokuma et al., 2000; Brown et al., 2005).

Os dados epidemiológicos do presente estudo dão suporte a essa hipótese, já que observamos forte associação entre animais de áreas rurais infestados com *R. sanguineus* e infecção por *E. canis* (OR=3,00; *P*= 0,00; IC 95% 1,38-6,51) e *A. platys* (OR= 4,38; *P*= 0,00; IC 95% 1,92-10,00).

E. ewingii e *E. chaffeensis* são transmitidos aos cães por *A. americanum* (Anziani et al., 1990; Ewing et al., 1995); entretanto não existe comprovação de que *Amblyomma* spp. seja vetor de *E. canis*. Johnson et al. (1998) sugerem que, considerando o fato de que *E. chaffeensis* e *E. canis* são geneticamente e antigenicamente semelhantes, ambas as espécies possam ser transmitidas por vetores semelhantes.

Os resultados do presente estudo também indicam a possibilidade de *A. cajennense* (OR=2,65; *P*= 0,01; IC 95% 1,27-5,56) poder atuar como vetor potencial de *E. canis* em áreas rurais de Minas Gerais, porém este fato tem que ser melhor estudado tentando-se comprovar esta transmissão.

Condições climáticas também reapresentam um importante fator na dinâmica da população dos carrapatos. Sob temperaturas abaixo de 17° C, os carrapatos apresentam um atraso na ovoposição, com interferência na eclosão dos ovos e aumento de duração da fase parasitária, o que resulta na redução no número de geração dentro de um ano (Soneshine, 1993).

As maiores prevalências de *E. canis* e *A. platys* foram encontradas em Nanuque (26,47 e 19,61%, respectivamente) e Belo Horizonte (24,49 e 7,22%, respectivamente), onde ocorre maior temperatura média anual, e maiores taxas de infestação de carrapatos. Em contrapartida, as menores prevalências foram encontradas em Lavras (1,03 e 4,08%, para *E. canis* e *A. platys*, respectivamente), onde registramos a menor temperatura média anual e as menores taxas de infestações de carrapatos. Estes dados sugerem a ocorrência de diapausa dos carrapatos na região de Lavras, o que possivelmente interfere na transmissão de patógenos por esses carrapatos. Este fato ainda é corroborado pela ausência de incidência de *E. canis* e *A. platys* em Lavras, enquanto que altas taxas de incidência foram observadas em Nanuque (7,69 e 22,81%, respectivamente) e Belo Horizonte (29,60 e 18,52%, respectivamente).

5. RESUMO DOS RESULTADOS

- Cães de áreas rurais de Nanuque, Belo Horizonte e Lavras são parasitados por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Boophilus microplus*. Em Lavras, além dessas espécies, ocorrem infestações por *Amblyomma tigrinum* e *A. ovale*;
- *A. cajennense* constitui a espécie mais prevalente, seguida pelo *R. sanguineus* e *B. microplus*;
- Os maiores índices de infestação por carrapatos ocorrem na região de Nanuque, seguida por Belo Horizonte e Lavras;
- A prevalência global de infecções por *B. canis vogeli* foi de 0,8% por meio de esfregaços sangüíneos, 9,9% por meio da PCR em tempo real e 28,7% por meio da RIFI;
- As prevalências de infecção por *B. canis vogeli* em cães das regiões de Nanuque e Belo Horizonte por meio da PCR em tempo real e RIFI são significativamente superiores à observada na região de Lavras;
- As incidências de *B. canis vogeli* em Nanuque foram 25,0 e 24,1%, por meio da RIFI e PCR em tempo real, respectivamente; em Belo Horizonte foram 31,6 e 4,2% por meio da RIFI e PCR em tempo real, respectivamente; e em Lavras foram de 0,0% e 1,5% por meio da RIFI e PCR em tempo real, respectivamente;
- A caracterização molecular revelou que os isolados de *B. canis vogeli* presentes em zonas rurais apresentaram alta identidade entre si e com isolados de zonas urbanas.
- A prevalência global de *Ehrlichia canis* nas três regiões por meio de PCR em tempo real foi de 16,1% e 44,7% por meio da RIFI;
- A prevalência global de *Anaplasma platys* nas três regiões por meio de PCR em tempo real foi de 11,7%;
- Os maiores índices de prevalência de *E. canis*, por meio de RIFI e PCR em tempo real, e de *Anaplasma platys* através PCR em tempo real, foram encontrados na região de Nanuque.
- A incidência de *E. canis* e *A. platys* nas regiões de Nanuque e Belo Horizonte por meio de PCR em tempo real é significativamente superior à observada na região de Lavras;

- Idade e Infestação por carrapatos constituíram fatores associados à infecção por *B. canis vogeli*;
- Constituíram fatores associados à maior positividade sorológica para *E. canis*: Idade, sexo masculino, raça mestiça (SRD) e infestação por carrapatos;
- Infestação por *R. sanguineus* ou *A. cajennense* foi fator associado à infecção por *E. canis*;
- Infestação por *R. sanguineus* foi fator associado à infecção por *A. platys*;
- As prevalências de infecção por *E. canis* e *A. platys* em cães de áreas rurais são significativamente superiores às de cães de áreas urbanas;
- As prevalências de infecções por *E. canis* e *A. platys* em cães de áreas urbanas são semelhantes, independentemente da região geográfica;
- Infestação por *R. sanguineus* é um fator associado à infecção por *E. canis* em cães de áreas urbanas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Infestações por carrapatos e infecções por hemoparasitas (*B. canis vogeli*, *E. canis*, e *A. platys*) em cães ocorrem de forma endêmica nas três áreas rurais (norte, centro e sul) do estado de Minas Gerais, sendo influenciadas pelas condições climáticas;
- Os maiores índices de infestação por carrapatos e conseqüentemente os maiores índices de prevalência e incidência de hemoparasitoses ocorrem em regiões de temperaturas mais elevadas (norte do estado);
- A técnica de PCR em tempo real é um método sensível para detecção e identificação de infecções por subespécies de *B. canis*, apresentando grandes vantagens quando comparada à detecção direta dos parasitos em esfregaços sangüíneos;
- *Babesia canis vogeli* foi à única espécie e/ou subespécie de *Babesia* encontrada infectando cães de áreas rurais de Minas Gerais;
- As amostras de *B. canis vogeli* presentes nas áreas rurais são homólogas entre si e homólogas às amostras de áreas urbanas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullahi, S.U.; Mohammed, A.A.; Trimnell, A.R. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine Babesiosis. **J. Small Anim. Pract.**, v. 31, p. 145-147, 1990.

Aboqe, G.O.; Jia, H.; Kuriki, K.; Zhou, J.; Nishikawa, Y.; Igarashi, I.; Fujisaki, K.; Suzuki, H.; Xuan, X. Molecular characterization of a novel 32-kDa merozoite antigen of *Babesia gibsoni* with a better diagnostic performance by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitol.**, v. 134, p. 1185-1194, 2007.

Aguiar, D.M.; Cavalcante, G.T.; Pinter, A.; Gennari, S.M.; Camargo, L.M.A.; Labruna, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p. 126-132, 2007.

Almeida, A.J.; Perni, C.F.R.; Mariano, F.A.; Melo, J.C.; Melo, V.C. Ocorrência de *Babesia* sp e *Ehrlichia* sp associada a parâmetros eritrocitários em Campos - RJ. In: **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, Rio de Janeiro. XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.**

Almeida, A.J.; Caldeira, M.S.; Mariano, F.A.; Souza, I.J. Ocorrência de *Babesia* sp.e *Ehrlichia* sp. em caninos domiciliados e não domiciliados no ano de 2005, em Campos dos Goytacazes, RJ. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**, p. 392, 2006.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-10, 1990.

Anderson, J.F.; Magnarelli, L.A.; Sulzer, A.J. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p. 2102-2105, 1980.

Anderson, B.E.; Dawson, J.E.; Jones, D.C.; Wilson, K.H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 12, p. 2838-42, 1991.

Anziani, O.S.; Ewing, S.A.; Barker, R.W. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 929-931, 1990.

Ayres, M.; Ayres JR., M.; Ayres, D.M.; Santos, A.S. **BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq. 2003. 290p.

Aragão, H.; Fonseca, F. Notas de ixodologia VIII. Lista e Chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 59, p. 115 – 130, 1961.

Baker, D.C.; Simpson, M.; Gaunt, S.D.; Corstvet, R.E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Vet. Pathol.**, v. 24, p. 449-53, 1987.

Bastos, C.V.; Moreira, S.M.; Passos, L.M. Retrospective study (1998–2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1026, p. 158–160, 2004.

Bellato, V.; Vieira, L.; Sartor, A.A.; Souza, A.P. Diagnóstico sorológico da infecção por *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis*, e *Borrelia burgdoferi* em cães do litoral de Santa Catarina. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 395, 2006.

Bicalho, K.A. **Uso da citometria de fluxo para detecção de *Babesia canis***. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 2001. 77 p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

Bicalho, K.A.; Ribeiro, M.F.B.; Martins-Filho, O.A. Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotozoan *Babesia canis* infection in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p. 221-235, 2004.

Birkenheuer, A.J.; Levy, M.G.; Savary, K.C.; Gager, R.B.; Breitschwerdt, E.B. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, p. 125-8, 1999.

Birkenheuer, A.J.; Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4172-7, 2003.

Boozer, A.L.; Macintire, D.K. Canine babesiosis. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 33, p. 885-904, 2003.

Borba, M.A.C.; Melo, V.S.P.; Alves, L.C.; McKee, W.; Barabarini-Junior, O.; Labarthe, N.V.; Faustino, M.A.G.; Azevedo, J.P.S. Diagnóstico Sorológico da Ehrlichiose Canina no Município de Cabo de Santo Agostinho, Estado de Pernambuco. In: **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002**, Rio de Janeiro, 2002.

Bose, R.; Jorgensen, W.K.; Dalgliesh, R.J.; Friedhoff, K.T.; de Vos, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 61-74, 1995.

Braccini, G.L.; Chaplin, E.L.; Stobbe, N.S.; Araujo, F.A.P.; Santos, N.R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande Do Sul, Brazil, 1986-1990. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, v. 20, p. 134-149, 1992.

Brown, G.K.; Martin, A.R.; Roberts, T.K.; Dunstan, R.H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 83, p. 101-2, 2005.

Buhles, W.C. Jr; Huxsoll, D.L.; Ristic, M. Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **J. Infect. Dis.**, v. 130, p. 357-67, 1974.

Bulla, C.; Takahira, R.K.; Araujo, J.P.; Trinca, L.A.; Lopes, R.S.; Wiedmeyer, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, v. 35, p. 141-146, 2004.

Cardoso, V.S.; Serra-Freire, N.M. Prevalência de *Babesia canis* em *Canis familiaris* de Silva Jardim e Teresópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil: Avaliação por esfregaço sanguíneo. **Entomol. Vect.**, v. 8, p. 359-364, 2001.

Carlos, R.S.A.; Paranhos, E.B.; Bezerra, R.A.; Pellizzoni, S.G.; Albuquerque, G.R. Prevalência de *Babesia canis* em cães do município de Ilhéus e Itabuna, Bahia. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**, p. 335, 2006a.

Carlos, R.S.A.; Bezerra, R.A.; Paranhos, E.B.; Pellizzoni, S.G.; Albuquerque, G.R. Comparação das técnicas de esfregaço sanguíneo e sorologia para diagnóstico de *Ehrlichia canis* em cães do município de Ilhéus e Itabuna, Bahia. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses.**, p. 379, 2006b.

Carret, C.; Walas, F.; Carcy, B.; Grande, N.; Precigout, E.; Moubri, K.; Schetters, T.P.; Gorenflot, A. *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, p. 298-303, 1999.

Casapulla, R.; Baldi, L.; Avallone, V.; Sannino, R.; Pazzanese, L.; Mizzoni, V. Canine piroplasmosis due to *Babesia gibsoni*: clinical and morphological aspects. **Vet. Rec.**, v. 142, p. 168-9, 1998.

Chang, A.C.; Chang, W.L.; Lin, C.T.; Pan, M.J.; Lee, S.C. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 58, p. 473-6, 1996.

Chang, W.L.; Pan, M.J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3142-6, 1996.

Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Feng, H.M.; Walker, D.H. Identification of the antigenic constituents of *Ehrlichia chaffeensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, p. 52-8, 1994.

Christophers, S.R. *Leukocytozoon canis*. **Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Gov. India New Ser.**, v. 26, p. 1-18, 1906.

Christophers, S.R. The sexual cycle of *Leukocytozoon canis* in the tick. **Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Gov. India New Ser.**, v. 28, p. 1-11, 1907.

Conrad, P.; Thomford, J.; Yamane, I.; Whiting, J.; Bosma, L.; Uno, T.; Holshuh, H.J.; Shelly, S. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 199, p. 601-5, 1991.

Conrad, P.A.; Thomford, J.W.; Marsh, A.; Telford, S.R. 3rd; Anderson, J.F.; Spielman, A.; Sabin, E.A.; Yamane, I.; Persing, D.H. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1210-5, 1992.

Costa, J.O.; Batista-Júnior, J.A.; Silva, M.; Guimarães, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. UFMG.**, v. 25, p. 199 – 200, 1973.

Dagnone, A.S.; Autran-de-Morais, H.S.; Vidotto, M.C.; Jojima, F.S.; Vidotto, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 117, p. 285-290, 2003.

Dagnone, A.S.; Brum, A.M.; Seiki, M.C.; Pascon, J.P.E.; Faria, J.L.M.; Silva, V.L.D.; Santana, A.E.; Tinucci-Costa, M.; Machado, R.Z. Diagnóstico molecular da erliquiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 354, 2004.

Dell'Porto, A. Estudo da ocorrência de *Babesia canis* em cães de rua da cidade de São Paulo. 1986. 94p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dell-Porto, A.; Oliveira, M.R.; Miguel, O. *Babesia canis* em cães de rua da cidade de São Paulo. I. Estudo comparativo de métodos de diagnóstico. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 27, p. 41-45, 1990.

Dell' Porto, A.; Oliveira, M.R.; Miguel, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 2, p. 37–40, 1993.

Diniz, P.P.V.P.; Araújo-Júnior, J.P.; Machado, R.Z.; Girio, R.J.S., De Moraes, H.S.A.; Schwartz, D.S. *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Leptospira interrogans* infection frequency in dogs with suspected hemoparasitosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 367, 2004.

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

Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and

- 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 2145-65, 2001.
- Ewing, S.A.; Dawson, J.E.; Kocan, A.A.; Barker, R.W.; Warner, C.K.; Panciera, R.J. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 32, p. 368–374, 1995.
- Fukumoto, S.; Xuan, X.; Shigeno, S.; Kimbita, E.; Igarashi, I.; Nagasawa, H.; Fujisaki, K.; Mikami, T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, p. 977-81, 2001.
- Furuta, P.I.; Machado, R.Z.; Oliveira, T.M.F.S.; Rocha, A.G.; Tinucci-Costa, M. Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-Teste) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 231, 2004.
- Galvão, M.A.M.; Mafra, C.L.; Lamounier, J.A.; Leite, R.C.; Walker, D.H. Rickettsioses emergentes e reemergentes em uma área endêmica do Estado de Minas Gerais-Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, v. 18, p. 1593-1597, 2002.
- Guerra, M.M.; Costa, R.T.; Ribeiro, M.F.B. Aspectos epidemiológicos da babesiose canina na cidade de Porteirinha, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 229, 2004.
- Hancock, S.I.; Breitschwerdt, E.B.; Pitulle, C. Differentiation of *Ehrlichia platys* and *E. equi* infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 4577-4578, 2001.
- Harrus, S.; Aroch, I.; Lavy, E.; Bark, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 247-50, 1997.
- Harvey, J.W.; Simpson, C.F.; Gaskin, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.**, v. 137, p. 182-188, 1978.
- Hauschild, S.; Shayan, P.; Schein, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 638-642, 1995.
- Hayden, J.D.; Ho, S.A.; Hawkey, P.M. et al. The promises and pitfalls of PCR. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 2, p. 129-137, 1991.
- Hervas, J.; Carrasco, L.; Gomez-Villamandos, J.C.; Mendez, A.; Sierra, M.A. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histopathological and ultrastructural study. **Vet. Rec.**, v. 137, p. 518-519, 1995.
- Hoskins, J.D. Ehrlichial disease of dogs: diagnosis and treatment. **Can. Pract.**, v. 16, p. 13–21, 1991a.

- Hoskins, J.D. Tick borne zoonosis: Lyme disease, Ehrlichiosis and Rock mountain Spotted fever. **Small anim.**, v. 6, p. 236–243, 1991b.
- Huxsoll, D.L.; Hildebrandt, P.K.; Nims, R.M.; Amyx, H.L.; Ferguson, J.A. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **J. Wildl. Dis.**, v. 6, p. 220-225, 1970.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura). **Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas**. San José, 1987. 79 p.
- Inokuma, H.; Raoult, D.; Brouqui, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 4219-4221, 2000.
- Iqbal, Z.; Chaichanasiriwithaya, W.; Rikihisa, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1658-62, 1994.
- Irwin, P.J.; Hutchinson, G.W. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. **Aust. Vet. J.**, v. 68, p. 204-209, 1991.
- Jain, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417 p.
- James, S.P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Govt. India New Ser.**, v. 14, p. 1-12, 1905.
- Jefferies, R.; Ryan, U.M.; Irwin, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Vet Parasitol.**, v. 144, p. 20-27, 2007.
- Jia, H.; Liao, M.; Lee, E.; Nishikawa, Y.; Inokuma, H.; Ikadai, H.; Matsuu, A.; Igarashi, I.; Xuan, X. Development of an immunochromatographic test with recombinant BgSA1 for the diagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Parasitol. Res.**, v. 100, p. 1381-1384, 2007.
- Johnson, E.M.; Ewing, S.A.; Barker, R.W.; Fox, J.C.; Crow, D.W.; Kocan, K.M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 74, p. 277-288, 1998.
- Keefe, T.J.; Holland, C.J.; Salyer, P.E.; Ristic, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 181, p. 236-238, 1982.
- Kikuth, W. A new cause of anaemia, *Bartonella canis* nov. sp. **Klin. Wochenschr.**, v.7, p. 1729, 1928.
- Kuehn, N.F.; Gaunt, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 186, p. 355-358, 1985.
- Kuttler, K.L. World wide impact of babesiosis. In: Ristic, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, Cap. 3, 1988. p. 2-22.

Labarthe, N.V.; Pereira, M.C.; Barbarini, O.; McKee, W.; Coimbra, C.A.; Hoskins, J. Serologic Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. **Vet. Therap.**, v. 4, p. 67-75, 2003.

Labruna, M.B.; Pereira, M.C. Carrapato em cães. **Clin. Vet.**, v. 6, p. 24-32, 2001.

Labruna, M.B.; Jorge, R.S.P.; Sana, D.A.; Jacomo, A.T.A.; Kashivakura, C.K.; Furtado, M.M.; Ferro, C.; Perez, S.A.; Silveira, L.; Santos, T.S. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Exp. Applied Acarology**, v. 36, p. 149-163, 2005.

Labruna, M.B.; McBride, J.; Camargo, L.M.A.; Aguiar, D.M.; Yabsley, M.J.; Davidson, W.R.; Stromdahl, E.Y.; Williamson, P.C.; Stich, R.W.; Long, S.W.; Camargo, E.P.; Walker, D.H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 189-195, 2007.

Latreille, P.A. **Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in familias disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata**. Paris et Argentorati, v. 1, 1806, 302 pp.

Levine, N.D. **Veterinary Protozoology**. Iowa State University Press. 1985, 414 pp.

Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B.; Moncol, D.J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. **Am. J. Vet. Res.**, v. 48, p. 339-341, 1987.

Lewis, G.E.Jr.; Ristic, M.; Smith, R.D.; Lincoln, T.; Stephenson, E.H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p. 1953-5, 1977.

Lima, M.M.; Lima, A.M.A.; Farias, M.P.O.; Ferreira, D.R.A.; Rodrigues, F.A.; Albuquerque, A.R.; D'Alencar, A.S.; Borges, J.C.G.; Faustino, M.A.G.; Alves, L.C.; Ramos, R.A.N.; Calado, A.M.C.; Silva, J.A.O. Frequência de hematozoários em cães atendidos no hospital veterinário do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV/DMV-UFRPE) no período de 2004-2005. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 328, 2006.

Linardi, P.M.; Guimarães, L.R. Sifonápteros do Brasil. 1. ed. Ed. Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000. 291 p.

Lobetti, R.G. Canine babesioses. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 20, p. 418-430, 1998.

Lopes, V.V.A.; Rubini, A.S.; Paduan, K.S.; Ribolla, P.E.M.; O'Dwyer, L.H. Estudo parasitológico e molecular da infecção por *Babesia* spp. em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 340, 2006.

Lucidi, C.A.; Angerami, J.T.S.; Rodrigues, R.R.; Takahira, R.K. Primeira ocorrência de *Babesia gibsoni* no Estado de São Paulo: Nota preliminar. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 231, 2004.

Machado, R.Z. **Estudo de imunidade celular e humoral na babesiose bovina**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP. 1991. 150 p. (Tese, Livre docência).

Macieira, D.B.; Messick, J.B.; Cerqueira, A.M.; Freire, I.M.; Linhares, G.F.; Almeida, N.K.; Almosny, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 44-48, 2005.

Maia, M.G., Costa, R.T., Haddad, J.P.A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid of the state Minas Gerais, Brazil. **Prev. Vet. Med.** v. 79, p. 155-162, 2007.

Martin, A.R.; Brown, G.K.; Dunstan, R.H.; Roberts, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Exp. Parasitol.** v. 109, n. 3, p. 176-80, 2005.

Martin, A.R.; Dunstan, R.H.; Roberts, T.K.; Brown, G.K. *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in Australia. **Exp. Parasitol.**, v. 112, p. 63-65, 2006.

Martinod, S.; Laurent, N.; Moreau, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 19, p. 245-254, 1986.

Massad, F.V.; Silva, B.C.D.; Bezerra, V.I.; Lopes, C.W.G. Estudo retrospectivo da babesiose em cães domiciliados na zona oeste do município do Rio de Janeiro – RJ. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 355, 2006.

Massard, C.A. **Hepatozoon canis (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) em cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1979. 121 p. (Tese, Doutorado em Parasitologia Veterinária).

Matjila, P.T.; Penzhorn, B.L.; Bekker, C.P.; Nijhof, A.M.; Jongejan, F. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. **Vet. Parasitol.**, v. 122, p. 119-125, 2004.

Matsuu, A.; Ono, S.; Ikadai, H.; Uchide, T.; Imamura, S.; Onuma, M.; Okano, S.; Higuchi, S. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 569–573, 2005.

Miranda, F.J.B.; Albernaz, A.P.; Melo-Jr, O.A.; Machado, J.A. Diagnóstico da babesiose canina em sangue periférico em cães da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 305, 2006.

Moreira, N.S.; Castro, E.M. Pesquisa de mórulas de *Ehrlichia canis* e achados hematológicos em uma população em cães (*Canis familiaris*) em Niterói – RJ. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 354, 2004.

Moreira, N.S.; Ferreira, C.E.F.; Nonato, N.; Oliveira, R.; Millington, A.; Martins, E. Oliveira, M.C.; Lemos, E.R.S. Avaliação da presença de mórulas de *Ehrlichia* sp. em esfregaços de cães (*Canis familiaris*) e de anticorpos contra *Rickettsia rickettsii* e *E. canis* em uma população de cães na região de surto da febre maculosa no Espírito Santo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 13, suplement. 1, p. 355, 2004.

Moreira, S.M.; Bastos, C.V.; Araújo, R.B.; Santos, M.; Passos, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 55, p. 141-147, 2003.

Moura, S.T.; Fernandes, C.G.N.; Ruffino, S.; Silva, V.L.; Oliveira-Júnior, P.A. Ocorrência de hemoparasitos em cães de Cuiabá, estado de Mato Grosso. In: **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2002, Rio de Janeiro. CD de Resumos. Rio de Janeiro, 2002.

Murphy, G.L.; Ewing, S.A.; Whitworth, L.C.; Fox, J.C.; Kocan, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 325-339, 1998.

Nuttall, G.H.F.; Warburton, C.; Robinson, L.E. **Ticks: a monograph of the ixodoidea, Part IV The genus *Amblyomma***. Cambridge University Press, 1926. 302 p.

O'Dwyer, L.H.O.; Guimarães, L.; Massard, C.L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, v. 4, p. 83-84, 1997.

O'Dwyer, L.H.O. **Diagnóstico de hemoparasitas e carrapatos de cães provenientes de áreas rurais em três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2000. 97f. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Oliveira, D.; Nishimori, C.T.; Costa, M.T.; Machado, R.Z.; Castro, M.B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by Dot-Elisa in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, p. 1-5, 2000.

Olmeda, A.S.; Armstrong, P.M.; Rosenthal, B.M.; Valladares, B.; del Castillo, A.; de Armas, F.; Miguelez, M.; Gonzalez, A.; Rodriguez Rodriguez, J.A.; Spielman, A.; Telford, S.R. 3rd. A subtropical case of human babesiosis. **Acta Trop.**, v. 67, p. 229-34, 1997.

Oteo, J.A.; Brouqui, P. Ehrlichiosis and human anaplasmosis. **Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.**, v. 23, p. 375-380, 2005.

Paraense, W.L.; Vianna, Y.L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 46, p. 595-603, 1948.

- Passos, L.M.; Geiger, S.M.; Ribeiro, M.F.; Pfister, K.; Zahler-Rinder, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 81-85, 2005.
- Patton, W.S. Preliminary report on a new piroplasm ("*Piroplasma gibsoni*" sp. nov.) found in the blood of the hounds of the madras Hunt and subsequently discovered in the blood of the jackal "*Canis aureus*". **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 3, p. 274-281, 1910.
- Paz e Silva, F.M.; Batista, T.N.; Araújo Jr, J.P. Routine molecular diagnosis of *Ehrlichia* in dogs in Brazil case report of 205 cases diagnosed by PCR. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 375, 2006.
- Pereira, E.A.; Speranza, L.; Santos, A.C.; Bertocco, L.H.C. Estudo epidemiológico de Erliquiose canina (*Ehrlichia* spp.) na região de São Carlos, SP, Brazil. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 378, 2006.
- Persing, D.H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1281-1285, 1991.
- Piana, G.P.; Galli-Valerio, B. Su di un infezione del cane com parassiti endoglobulari. **Il Moderno Zootro.**, v. 6, p. 163-169, 1895.
- Pichotano, M.E.; Varzim, F.L.S.B.; Silva, M.A.M.L. Ocorrência de erliquiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 356, 2004.
- Pires, F.A.; Almosny, N.R.P.; Barreira, J.D.; Silva, G.V.O.; Massard, C.L. Prevalência de *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães domésticos (*Canis familiaris*) oriundo de áreas rurais do município de Barra do Piraí, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 240, 2004.
- Raymond, R.J.; Palmer, G.H.; Knowles, D.P. The polymerase chain reaction: a new tool for detecting haemoparasitic disease. **Anaplasmosis, Babesiosis network Newsletter**, v. 2, p. 1-2, 1990.
- Ribeiro, M.F.B.; Passos, L.M.F.; Lima, J.D.; Guimarães, A.M. Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.**, v. 42, p. 511-517, 1990.
- Ribeiro, V.L.S.; Weber, M.A.; Fetzer, L.O.; Vargas, C.R.B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciênc. Rural.**, v. 27, p. 285-289, 1997.
- Rikihisa, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.

- Ristic, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- Rodrigues, A.F.S.F.; D'Agosto, M. Daemon, E. *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) (Apicomplexa: Babesiidae) em cães de rua do Município de Juiz de Fora, MG, **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 24, p. 17–21, 2002.
- Rodrigues, D.; Daemon, E.; Rodrigues, A.F.S.F.; Feliciano, E.A.; Soares, A.O.; Souza, A.D. Levantamento de hemoparasitos em cães da área rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 371, 2004.
- Rodrigues-Daemon, D.F.; Daemon, E.; Nascimento, A.C.B.M.; Arantes-Godinho, J.; Oliveira, M.C. Diagnóstico e tratamento de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) em cães de Juiz de Fora – MG. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses**. p. 376, 2006.
- Rodriguez-Vivas, R.I.; Alborno, R.E.F.; Bolio, G.M.E. Ehrlichia canis in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 75–79, 2005.
- Rubini, A.S.; Lopes, V.V.A.; O'Dwyer, L.H. Prevalência e parasitemia de *Hepatozoon canis* em cães de área rural de Botucatu e Rio Claro – Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 243, 2004.
- Sainz, A.; Delgado, S.; Amusatogui, I.; Tesouro, M.; Carmenes, P. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leon (north–west Spain). **Prev. Vet. Méd.**, v. 29, p. 1–7, 1996.
- Santos, J.P.; Santos, M.P.; Silva, T.K.; Mundim, E.D.; Cabral, A.D.; Cabral, D.D. Frequência de hemoparasitos em cães (*Canis familiaris*) no município de Uberlândia, MG, Brasil: Avaliação por esfregaço sanguíneo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 372, 2004.
- Schettters, T.P.; Scholtes, N.C.; Kleuskens, J.A.; Bos, H.J. Not peripheral parasitaemia but the level of soluble parasite antigen in plasma correlates with vaccine efficacy against *Babesia canis*. **Parasite Immunol.**, v. 18, p. 1-6, 1996.
- Schettters, T.P.; Moubri, K.; Precigout, E.; Kleuskens, J.; Scholtes, N.C.; Gorenflot, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, Pt 5, p. 485-493, 1997.
- Seibert, M. et al. Ocorrência de *Ehrlichia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em cães conduzidos ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.25, p. 84-94, 1997.
- Shaw, S.E.; Dayb, M.J.; Birtles, R.J.; Breitschwerdt, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 74-80, 2001.

- Smith, R.D.; Sells, D.M.; Stephenson, E.H.; Ristic, M.R.; Huxsoll, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **Am. J. Vet. Res.**, v. 37, p. 119-126, 1976.
- Soares, A.O.; Souza, A.D.; Feliciano, E.A.; Rodrigues, A.F.S.F.; D'Agosto, M.; Daemon, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 15, p. 13-16, 2006.
- Sonenshine, D.E. **Biology of tick**. Vol. 2. Oxford University Press, 1993, 465 pp.
- Souza, A.I.; Dagnone, A.S.; Machado, R.Z. Infecção por *Anaplasma platys* em cães de Campo Grande – MS. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, suplement. 1, p. 352, 2004.
- Spiewak, G. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico da infecção por *Babesia canis*, em cães atendidos em clínicas Veterinárias em Belo Horizonte**. 1992. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Stephenson, E.H.; Clothier, E.R.; Ristic, M. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Virginia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 167, p. 71-2, 1975.
- Suksawat, J.; Hegarty, B.C.; Breitschwerdt, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 14, p. 50-5, 2000.
- Swango, L.J.; Bankemper, K.W.; Kong, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infection. In: ETTINGER, S.J. **Textbook of veterinary internal medicine**. Philadelphia : Saunders, 1989. Cap.46. p.265-297.
- Taboada, J.; Merchant, S.R. Babesiosis of companion animals and man. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 21, p. 103-123, 1991.
- Teglas, M.; Matern, E.; Lein, S.; Foley, P.; Mahan, S.M.; Foley, J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Vet. Parasitol.**, v. 131, p. 119-127, 2005.
- Todorovic, R.A.; Kuttler, K.L. A babesiosis card agglutination test. **Am. J. Vet. Res.**, v. 35, p. 1347-1350, 1974.
- Todorovic, R. Serological diagnosis of babesiosis. A review. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 7, p. 1-14, 1975.
- Trapp, S.M.; Messick, J.B.; Vidotto, O.; Jojima, F.S.; Morais, H.S. Babesia gibsoni genotype Asia in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v 141, p. 177-80, 2006a.
- Trapp, S.M.; Dagnone, A.S.; Vidotto, O.; Freire, R.L.; Amude, A.M.; Autran de Morais, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet. Parasitol.**, v 140, p. 223-230, 2006b.

Uilenberg, G.; Franssen, F.F.; Perie, N.M.; Spanjer, A.A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Vet. Q.**, v. 11, p. 33-40, 1989.

Vilar, T.D.; Volino, W.; Nalim, M.B.; Barros, N.U.M.; Stelling, W.; Nascimento, M.D.; Serra-Freire, N.M.; Valim, M.P.; Almosny, N.R.P. Registro de Infecção no Rio de Janeiro Brasil por *Hepatozoon* sp. e *Ehrlichia* sp. em Cão (*Canis familiaris*) proveniente de Aruba, Caribe. **Nosso Clínico**, v. 31, p. 28-30, 2004.

Wagner, G.; Cruz, D.; Holman, P.; Waghela, S.; Perrone, J.; Shompole, S.; Rurangirwa, F. Non-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87, Suppl 3, p.193-9, 1992.

Wen, B.; Rikihisa, Y.; Mott, J.M.; Greene, R.; Kim, H.Y.; Zhi, N.; Couto, G.C.; Unver, A.; Bartsch, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1852-1855, 1997.

Wilson, B.J. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 28, p. 381-383, 1992.

Wlosniewski, A.; Leriche, M.A.; Chavigny, C.; Ulmer, P.; Donnay, V.; Boulouis, H.J.; Mahl, P.; Druilhe, P. Asymptomatic carriers of *Babesia canis* in an enzootic area. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, p. 75-86, 1997.

Woody, B.J.; Hoskins, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 21, p. 75-98, 1991.

Zahler, M.; Schein, E.; Rinder, H.; Gothe, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 544-548, 1998.

Zahler, M.; Rinder, H.; Schein, E.; Gothe, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 89, p. 241-248, 2000.

8. ANEXO

Epidemiologia molecular de hemoparasitos de cães em Minas Gerais

Ficha Nº _____

Município: _____ Zona: () Rural () Urbana

Data: ____/____/____

1. Dados da Propriedade

1.1. Propriedade: _____ 1.2. Proprietário: _____

1.3. Localidade: _____

1.4. Ponto de referência: _____

1.5. Ambiente: _____

1.6. Outros Animais domésticos: () Sim () Não Quais? _____

1.7. Animais silvestres: () Sim () Não Quais? _____

2. Dados dos Cães

2.1. Mantidos: () Soltos () Presos

2.2. Alimentação: () Ração () Restos de comida

2.3. Acesso a outros animais: () Sim () Não Quais? _____

2.4. Outros cães não coletados: () Sim () Não

CÃO: _____

Raça: _____ Sexo: () Macho () Fêmea

Idade: () <6 meses () 6 meses a 2 anos () 2 a 5 anos () >5 anos

Porte: () Pequeno () Médio () Grande

Pelagem: _____

Presença de ectoparasitos: () Sim () Não

Anemia: () Sim () Não